



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Disección funcional de *enhancers* transcripcionales específicos del gen del receptor de dopamina D2 (*Drd2*) mediante el uso de ratones transgénicos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Juan Ramiro Lorenzo Lopez

Director de tesis: Dr. Marcelo Rubinstein

Consejero de Estudios: Dr. Marcelo Rubinstein

Lugar de trabajo: Instituto en Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular,
Dr. Héctor N. Torres (INGEBI)

Buenos Aires, 2015

Disección funcional de *enhancers* transcripcionales específicos del gen del receptor de dopamina D2 (*Drd2*) mediante el uso de ratones transgénicos

RESUMEN

El receptor de dopamina D2 (D2R) juega un rol fundamental en la integración de respuestas motoras, emocionales y cognitivas y está involucrado en enfermedades neurológicas y psiquiátricas de alta prevalencia, que incluyen la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia y la administración compulsiva de drogas de abuso. A pesar de su importancia, los mecanismos moleculares que controlan la expresión de *Drd2* en los distintos tipos celulares son desconocidos. En este trabajo realizamos un estudio de las regiones conservadas presentes en el *locus* de *Drd2* con el objetivo de investigar si dirigen la expresión de transgenes reporteros en diferentes áreas y tipos celulares del cerebro y de la hipófisis del ratón. Mediante el uso de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) recombinantes generamos inicialmente ratones transgénicos portadores de construcciones de gran tamaño que permitieron identificar una región de 60 kb que dirige la expresión de un gen reportero a distintos tipos neuronales y celulares donde normalmente se expresa *Drd2*. A partir de esa información realizamos una disección genética y funcional de esta región de 60 kb. Un fragmento de 15 kb, que incluye el primer exón de *Drd2*, y otro de 7 kb, localizado en extremo 3' del primer intrón, dirigen la expresión de genes reporteros a diferentes áreas del cerebro. Mientras la primera tiene como área de dominio principal al *septum* lateral, la segunda activa la expresión en el núcleo estriado y en las áreas dopaminérgicas del cerebro medio. En este último fragmento identificamos dos elementos conservados de aproximadamente 500 pares de bases, que funcionan como *enhancers* transcripcionales, dirigiendo la expresión reportera a distintas poblaciones neuronales, uno a neuronas estriatales y el otro a neuronas pertenecientes al cerebro medio. Estos resultados constituyen un paso fundamental para comprender el código de elementos regulatorios que controlan la expresión de *Drd2* y aporta nuevas herramientas genéticas para estudiar la participación del D2R en diferentes tipos celulares y circuitos neuronales.

Palabras clave: *Drd2*, receptor D2, *enhancer*, transcripción, cerebro.

Functional dissection of transcriptional enhancers of the dopamine receptor D2 gene (*Drd2*) using transgenic mice

ABSTRACT

The dopamine D2 receptor (D2R) plays a major role in the integration of motor, emotional and cognitive responses, is also involved in neurological and psychiatric diseases of high prevalence. Despite its significance, the molecular mechanisms that control the expression of the D2R gene (*Drd2*) in different tissues remain unknown. In this work we studied the conserved regions in the *Drd2* locus, with the aim of testing their capacity to direct reporter gene expression to the different areas and cellular types in mouse brain and pituitary. By using recombineering techniques in bacterial artificial chromosomes (BAC) we were able to produce transgenic mice harboring large transgenes. This allowed us to identify a 60 kb region capable of directing gene reporter expression to several neural and cellular types where *Drd2* is normally expressed. From here we made a genetic and functional dissection of the 60 kb region. One 15 kb fragment, which includes the first exon of *Drd2*, and other of 7kb, at 3' of the first intron, are capable of directing reporter genes to different brain regions. Whereas the first dominates mainly the expression on lateral septum, the second activates expression on the striatal nucleus and dopaminergic midbrain areas. In this last fragment we found two conserved elements approximately of 500 pair base long that work like transcriptional enhancers directing the reporter expression to different neuronal population, one to striatal neurons and the other to midbrain neurons. These results establish a fundamental step in the comprehension of the regulatory elements code that control *Drd2* expression and, furthermore, contribute to the development of new genetic tools for the study of D2R function on different cellular types and neuronal circuits.

Key words: *Drd2*, D2 receptor, enhancer, transcription, brain.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires y a la Universidad Nacional de San Luis, por mi formación académica gratuita y de excelencia.

A CONICET por permitirme dedicarme exclusivamente al desarrollo de la Tesis y al Estado Argentino por su soporte al sistema científico.

A mi director por permitirme formar parte de su proyecto científico, por guiarme y aconsejarme a lo largo de la Tesis, por transmitirme su pasión científica, por su compromiso y esfuerzo para que las cosas funcionen.

Al Dr. Torres fundador del INGEB y a la Dra. Flawiá por permitirme realizar el doctorado en esta reconocida institución.

A la Dra. Elena Avale y la Lic. Sonia Espindola por su ayuda en el diseño y la producción de lentivirus. Al Dr. Nicolás Frankel por compartir la técnica de recombinación en BACs. A la Dra. Franchini por ayudarme con los análisis bioinformáticos.

Al mis compañeros de laboratorio, la gente de Dopamina: Agustina (Te debo una pinta... ¿o dos?), Eric y Rodrigo. También a la gente de POM-C: las Danis, Laura y particularmente a Sofía y Flavio por sus consejos moleculares y bioinformáticos. A Jérica por la ayuda ratonil. A los ex del laboratorio, Tete, Sabi, Gretel, Vivi y Dani, que me ayudaron a dar mis primeros pasos en el laboratorio.

A la gente del laboratorio de los 3 patitos y en particular a Fran, Lean y Gonza por su amistad, por adoptarme como un integrante más y por los años de café y torta. A la gente que hace posibles eventos tales como la TaLuIN, BB y PHP, ideales para cerrar el día.

A mamá, papá y mi familia sanluisense que me alentaron a la distancia. A la abuela Gisela que me alentó a la media distancia. A Romi por el aguante, el cariño y la ayuda en las correcciones.

A los ex INGEBIs Javi, Flor, David y Briardo, por su amistad que aún continúa y porque me ayudaron siempre que pudieron.

A mis amigos Diego, el Enano, Pablo, Rubén, Mingo, Mariana y Laura por los encuentros que han sido postergados en los últimos meses.

A los integrantes del INGEBI en general por su buena predisposición. A Mauro por la taqUBA necesaria y no por las patadas innecesarias. A Rubén, Norma y Gladis por el soporte imprescindible.

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCIÓN.....	9
1. La dopamina en el cerebro y la hipófisis.....	10
1.1. La vía nigroestriatal.....	11
1.2. Las vías mesolímbica y mesocortical.....	12
1.3. La vía tuberoinfundibular.....	13
1.4. Otros sistemas dopaminérgicos.....	13
2. Los receptores dopaminérgicos.....	14
2.1. Clasificación.....	14
2.2. Estructura génica de los receptores.....	15
2.3. Función de los receptores.....	16
2.4. Los receptores dopaminérgicos y los circuitos de los ganglios de la base.....	17
2.5. Expresión de los receptores dopaminérgicos.....	19
3. Regulación de la expresión génica.....	20
3.1. Control modular de la transcripción.....	21
3.2. Arquitectura de <i>enhancers</i> transcripcionales.....	23
3.3. Modificaciones de la cromatina.....	24
3.4. <i>Enhancers</i> en enfermedades (<i>enhancer</i> -o-patías).....	25
3.5. Identificación de <i>enhancers</i> y sus funciones.....	25
3.6. ENCODE: La enciclopedia de elementos regulatorios de ADN.....	27
4. Construcción de ratones transgénicos con BACs.....	28
4.1. El proyecto GENSAT.....	29
4.2. El uso de BACs en la disección de los circuitos de los ganglios de la base.....	30
4.3. Los BACs y su utilidad en la búsqueda de <i>enhancers</i>	32
OBJETIVOS.....	33
Objetivo general.....	33
Objetivos particulares.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
1. Sesenta kilobases del <i>locus</i> de <i>Drd2</i> de ratón contienen elementos regulatorios necesarios para su expresión en cerebro e hipófisis.....	34

2. Identificación de regiones que dirigen la expresión de <i>Drd2</i> en diferentes áreas del cerebro.....	43
2.1. Expresión de Td2 en el cuerpo estriado.....	46
2.2. Expresión de Td2 en el cerebro medio.....	48
2.3. Expresión de Td2 en el septum y la corteza prefrontal medial.....	49
2.4. Expresión de Td2 en el núcleo arcuato del hipotálamo y la hipófisis.....	50
3. Análisis de la expresión de Td2 en neuronas que expresan <i>Drd2</i>	52
3.1. Coexpresión en ratones transgénicos [-5/+10] <i>Drd2</i> -Td2 y <i>Drd2</i> -EGFP.....	53
3.2. Coexpresión de Td2 y EGFP en ratones transgénicos [+43/+50] <i>Drd2</i> -Td2 y <i>Drd2</i> -EGFP.....	57
4. Análisis de expresión del promotor proximal de <i>Drd2</i>	61
5. <i>Footprinting</i> filogenético y epigenético de las regiones -5/+10 y +43/+50.....	65
6. Los elementos conservados +45 y +46 dirigen la expresión de Td2 de manera diferencial al estriado y al cerebro medio.....	71
7. Posibles FTs implicados en los ensayos de actividad de <i>enhancers</i>	77
8. Uso de los nuevos <i>enhancers</i> de <i>Drd2</i> para el direccionamiento de vectores lentivirales en el cerebro de ratón.....	81
CONCLUSIONES.....	86
MATERIALES Y MÉTODOS.....	89
1. Animales y Bioterio.....	89
2. Genotipificación de ratones.....	89
3. Producción de ratones transgénicos.....	90
4. Análisis de expresión.....	92
5. Generación de BACs recombinantes.....	95
6. Construcciones plasmídicas.....	98
7. Producción e inyección de lentivirus.....	102
8. Herramientas y análisis bioinformáticos.....	103
ANEXO.....	106
BIBLIOGRAFÍA.....	114

ABREVIATURAS

CR: campo retrorubral

BAC: cromosoma artificial bacteriano (del inglés *bacterial artificial chromosome*)

ChAT: colina acetil transferasa

D2R: receptor de dopamina D2

DR: rafe dorsal

Drd2: gen que codifica para el receptor de dopamina D2

EGFP: proteína fluorescente verde mejorada (del inglés *enhanced green fluorescence protein*)

EST: cuerpo estriado

GP: Globo pálido

h: hora

i.p.: Intraperitoneal

kb: kilobases

mPFC: corteza prefrontal medial

MSNs: neuronas espinosas medianas

NAc: núcleo accumbens

NE: núcleo endopiriforme

NST: núcleo subtalámico

O/N: durante la noche (del inglés *overnight*)

OP: núcleo olivar pretectal

pb: pares de bases

Pomc: proopiomelanocortina

RN: receptor nuclear

SNc: *substantia nigra pars compacta*

SNr: *substantia nigra pars reticulata*

Td2: Tdimer2 (del inglés *tandem dimer 2*)

TH: tirosina hidroxilasa

TK: promotor mínimo de la timidina quinasa del herpes simplex

TO: Tubérculo olfatorio

TSS: sitio de inicio de la transcripción (del inglés *transcription start site*)

Ttc12: gen tetratricopeptide repeat domain 12

VTA: área tegmental ventral (del inglés *ventral tegmental area*)

INTRODUCCIÓN

La dopamina es uno de los principales neurotransmisores en el sistema nervioso central, se encuentra implicada en funciones críticas como el movimiento voluntario, la alimentación, el afecto, el estímulo de recompensa, el sueño, la atención, la memoria de trabajo, el aprendizaje y el control de la liberación de hormonas. Existe una gran cantidad de patologías relacionadas con la disfunción de los sistemas dopaminérgicos, entre las más estudiadas se encuentran la enfermedad de Parkinson, el déficit de atención e hiperactividad y las patologías adictivas, cuyas prevalencias en la sociedad moderna se encuentran en constante aumento.

La dopamina actúa a través de receptores transmembrana acoplados a proteínas G. Hasta la actualidad se conocen 5 subtipos, que se encuentran distribuidos de manera diferencial en distintas áreas del cerebro y en la hipófisis. Uno de estos receptores, el receptor de dopamina D2 (D2R), juega un rol fundamental en la integración de respuestas motoras, emocionales y cognitivas y está involucrado en enfermedades neurológicas y psiquiátricas de alta prevalencia como la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia y la adicción a drogas de abuso. Debido a la gran diversidad de funciones del D2R, no resulta extraña su presencia en distintos circuitos cerebrales. Si bien existe una gran cantidad de estudios fisiológicos y farmacológicos que permiten comprender las funciones que cumple el D2R, los mecanismos moleculares que controlan su expresión son aún desconocidos.

El avance de los Proyectos Genoma de múltiples vertebrados confirmó que solo una mínima porción de los genomas (~1,5%) contiene regiones que codifican proteínas. El resto de las secuencias conservadas (~3,5%) se encuentran en regiones intergénicas e intrónicas y se supone que están constituidas mayoritariamente por elementos regulatorios que controlan dónde, cuándo y en qué cantidad se expresa cada gen. Esto impulsó estudios tendientes a entender cómo se encuentra controlada la expresión de numerosos genes en el cerebro y en otros tejidos, tanto durante el desarrollo como en la adultez. Algunos de estos esfuerzos se canalizaron en proyectos multicéntricos de gran magnitud como ENCODE (Gong *et al.*, 2003) y GENSAT (Schmidt *et al.*, 2013). Sin embargo, la gran cantidad de información que brindan estos proyectos es solo parcial, y es necesario realizar ensayos experimentales para comprender la función de estas regiones no codificantes.

1. La dopamina en el cerebro y la hipófisis

La 3,4-dihidroxifeniletilamina (dopamina), descubierta por Carlsson *et al.* en 1957, es un neurotransmisor de la familia de las catecolaminas. La biosíntesis de dopamina tiene como precursor principal al aminoácido L-tirosina, que es convertido a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Finalmente, la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) convierte la L-DOPA en dopamina (Figura 1).

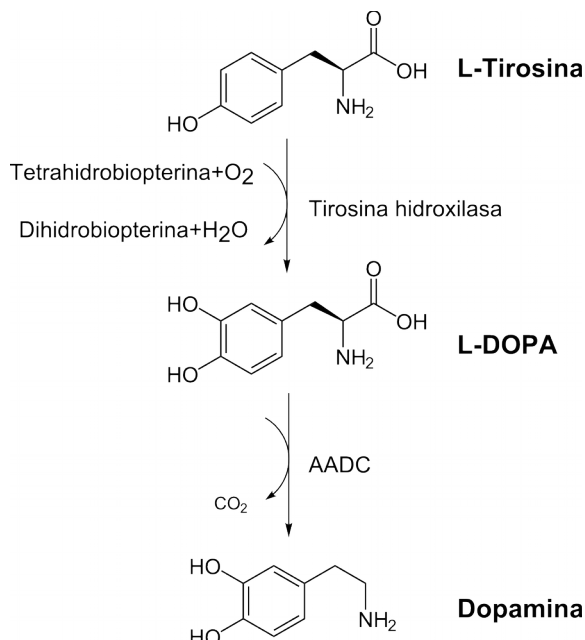


Figura 1. Vía biosintética de la dopamina. La tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la biosíntesis de las catecolaminas, transforma el aminoácido L-tirosina en L-DOPA, que luego es descarboxilada por la DOPA-decarboxilasa (AADC), generando dopamina.

Años después Dahlström y Fuxe (1964) publicaron la primera descripción detallada de la distribución de las neuronas con contenido de catecolaminas y de serotonina en el cerebro de rata. Identificaron 12 grupos de células catecolaminérgicas, designados A1-A12 y distribuidos desde el bulbo raquídeo hasta el hipotálamo. Cinco grupos adicionales, A13-A17, localizados en el diencefalo, el bulbo olfatorio y la retina fueron agregados posteriormente. Los grupos dopaminérgicos localizados en el cerebro se hallan numerados desde el A8 al A16, mientras que los grupos A1 a A7 son adrenérgicos y noradrenérgicos. Esta nomenclatura se ha mantenido a lo largo de los años resultando de probada utilidad debido a que generalmente las células catecolaminérgicas no se hallan confinadas de manera definida a una sola estructura anatómica y la distribución de sus cuerpos celulares varía entre las diferentes especies de mamíferos (Björklund y Dunnett, 2007).

En mamíferos el sistema dopaminérgico central se encuentra comprendido por cuatro vías principales (Dahlström y Fuxe, 1964): la vía nigroestriatal originada en las neuronas A9 de la *substantia nigra pars compacta* (SNc); la mesolímbica y la mesocortical originadas en las neuronas A10 del área tegmental ventral (VTA); y la tuberoinfundibular originada en las neuronas del A12 en el núcleo arcuato. Las vías dopaminérgicas originadas en los núcleos A9 y A10 son críticas para el control del movimiento voluntario, la alimentación, el afecto, el estímulo de recompensa, el sueño, la atención, la memoria de trabajo y el aprendizaje, mientras que el núcleo A12 concentra neuronas que participan del control de la liberación de hormonas (Iversen y Iversen, 2007; Missale *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 1970).

1.1. La vía nigroestriatal

La vía dopaminérgica nigroestriatal se origina en los cuerpos celulares del grupo A9, localizados en la SNc y proyectan sus axones hacia el núcleo estriado en donde se libera dopamina que estimula los receptores dopaminérgicos presentes en neuronas espinosas medianas (MSNs) (Figura 2). Las MSNs son neuronas de proyección GABAérgicas y componen el 90% de las neuronas estriatales. Se dividen principalmente en dos poblaciones dependiendo de sus eferencias y el efecto que la dopamina ejerce sobre las ellas (Kawaguchi, 1997). Las MSNs que expresan el receptor de dopamina D1, sustancia P y dinorfina forman parte del circuito motor extrapiramidal directo. Las MSNs que expresan el D2R y el neuropéptido encefalina pertenecen al circuito motor extrapiramidal indirecto. El conjunto de núcleos cerebrales subcorticales que integran estos circuitos de control motor se denomina ganglios de la base que, además del cuerpo estriado, incluye al globo pálido, sustancia nigra reticulada y núcleo subtalámico. La dopamina cumple un papel fundamental en el planeamiento, iniciación y coordinación de los movimientos voluntarios y comportamientos complejos (Graybiel, 1990). Las neuronas del grupo A9 producen el 70% de la dopamina liberada en el cerebro y su degeneración progresiva es el rasgo histopatológico típico de la enfermedad de Parkinson, caracterizada por la existencia de temblor, rigidez postural y dificultad para iniciar y controlar el movimiento (Hornykiewicz, 1970). Un componente minoritario de la innervación dopaminérgica estriatal está compuesto por fibras que arriban del campo retrorubral del grupo de neuronas A8 localizado de manera dorsolateral y caudal respecto del A9 (Halász *et al.*, 1985).

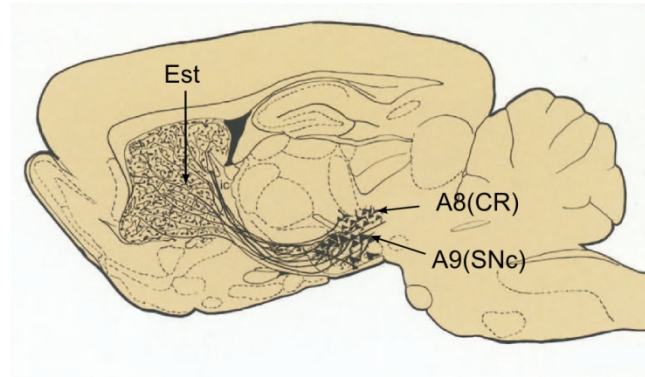


Figura 2. El sistema dopaminérgico nigroestriatal. Las neuronas de la vía dopaminérgica nigroestriatal (A9) presentan los cuerpos celulares en la SNc, y proyectan sus axones hacia el cuerpo estriado (Est). Las neuronas dopaminérgicas del A8 en el campo retrorubral (CR) representan una minoría de las proyecciones estriatales. Adaptado de Halász *et al.* (1985).

1.2. Las vías mesolímbica y mesocortical

Estas vías se originan en el VTA del cerebro medio, en un grupo de neuronas dopaminérgicas denominado A10. Los axones de estas neuronas forman el tracto mesocorticolímbico y posteriormente se dividen dando lugar a las dos vías. La vía mesolímbica tiene como áreas blanco el núcleo *accumbens*, el tubérculo olfatorio, la amígdala y la corteza piriforme (Figura 3). Este sistema participa de los circuitos de recompensa, placer y gratificación y su desbalance da lugar a comportamientos compulsivos y patologías tales como la adicción a drogas de abuso. Los estimulantes psicomotores cocaína y anfetamina, los narcóticos opioides heroína y morfina, y las drogas de uso permitido como el etanol y la nicotina, producen efectos gratificantes y sensaciones de euforia y placer al activar al sistema mesolímbico (Di Chiara *et al.*, 2004). Por otro lado, el sistema mesocortical tiene como áreas blanco la corteza prefrontal, la corteza cingulada y la corteza entorrinal. Estas regiones corticales se hallan vinculadas con funciones emocionales, motivacionales y cognitivas, y su disfunción puede observarse en patologías psiquiátricas tales como la esquizofrenia (Carlsson, 1988; Seeman, 1987).

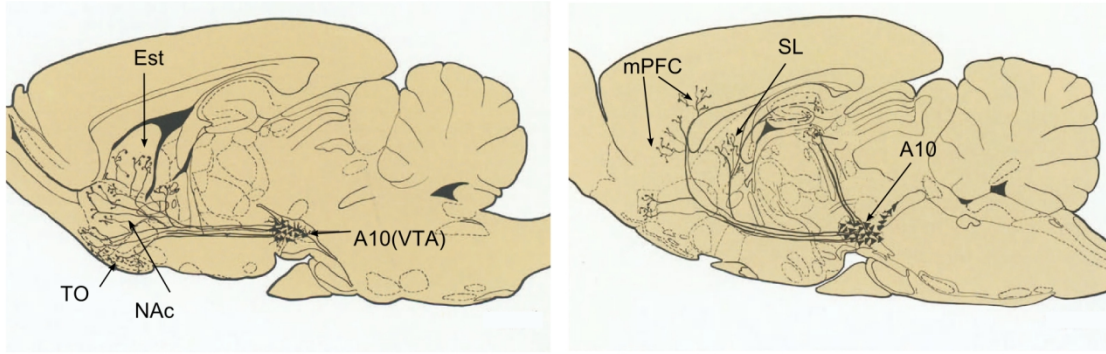


Figura 3. Sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. El sistema mesocorticolímbico posee los cuerpos celulares en el VTA (A10). En el esquema sagital lateral de la izquierda se indican las proyecciones hacia el núcleo *accumbens* (NAc), y el tubérculo olfatorio (TO), algunas de estas también llegan al cuerpo estriado (Est). En el esquema sagital medial de la derecha se observan las proyecciones del A10 que llegan hasta la corteza prefrontal medial (mPFC) y el *septum* lateral (SL), entre otros. Adaptado de Halász *et al.* (1985).

1.3. La vía tuberoinfundibular

La vía tuberoinfundibular es un sistema neuroendócrino compuesto por un grupo de neuronas dopaminérgicas ubicadas en el núcleo arcuato del hipotálamo (A12) (Figura 3). Estas neuronas inervan densamente la capa externa de la eminencia media terminando en los vasos portales hipofisarios y, de esta manera, la dopamina es transportada hasta la hipófisis anterior a través del sistema portal. La dopamina liberada por las neuronas del grupo A12 en los vasos portales regula la síntesis y liberación de prolactina, mientras que otras fibras tuberoinfundibulares inervan directamente el lóbulo intermedio y controlan la síntesis y liberación de péptidos derivados de la proopiomelancortina (Pomc). Las alteraciones en esta vía neuroendocrina modifican la liberación de hormonas hipofisarias generando problemas metabólicos y de fertilidad, y pueden conducir al desarrollo de tumores hipofisarios (Kelly *et al.*, 1997).

1.4. Otros sistemas dopaminérgicos

Si bien las tres vías dopaminérgicas centrales descritas anteriormente son las más estudiadas en cerebro, también se observan otros circuitos con implicancias mayormente locales como los grupos A11 a A14 (Figura 4). El grupo neuronal A11, perteneciente al sistema dopaminérgico mesencefálico periacueductal, produce inervaciones locales y periventriculares pero también genera inervaciones en la médula espinal. El sistema incerto-hipotalámico, originado en el grupo neuronal A13 de la zona *incerta*, da lugar a inervaciones locales y periventriculares que alcanzan el *septum*, el hipotálamo y el área preóptica medial. El sistema hipotalámico periventricular anterior, en conjunción con el sistema preóptico periventricular, pertenecen al

grupo A14, se hallan en la región rostrocaudal del hipotálamo y el área preóptica, produciendo inervaciones locales en el hipotálamo y en la región preóptica. El grupo neuronal dopaminérgico A15 se ubica en el hipotálamo ventro lateral mientras que el grupo A16 se localiza en el bulbo olfatorio y regula la actividad del glomérulo olfatorio (Halász *et al.*, 1985). La descripción más o menos pormenorizada de los distintos grupos de neuronas dopaminérgicas y sus áreas de proyección que destacamos en este trabajo tiene por objetivo exponer la gran cantidad de circuitos cerebrales donde participa la dopamina y la alta variedad de tipos neuronales que expresan receptores dopaminérgicos.

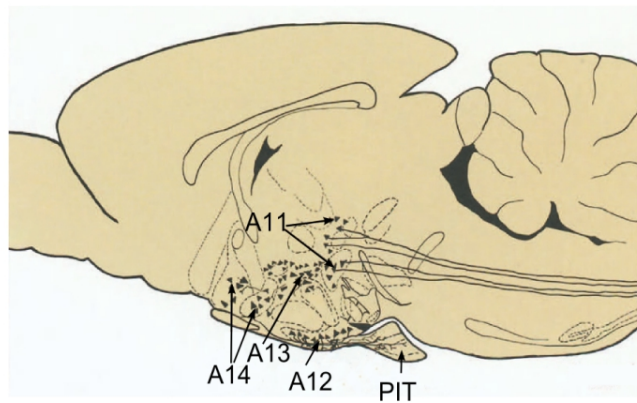


Figura 4. Vía tuberuloinfundibular y otros sistemas dopaminérgicos. La vía tuberuloinfundibular se origina en el núcleo arcuato del hipotálamo (A12) e inerva el lóbulo intermedio de la hipófisis y la circulación portal. También se observan otros núcleos dopaminérgicos: el A11, que inerva la médula espinal, y los circuitos hipotalámicos locales A13 y A14. Adaptado de Halász *et al.* (1985).

2. Los receptores dopaminérgicos

2.1. Clasificación

Los efectos fisiológicos de la dopamina se encuentran mediados por cinco subtipos de receptores transmembrana acoplados a proteínas G. A finales de los '70 se propuso la existencia de dos tipos de receptores de dopamina, basándose en cómo afectan la actividad de la adenilato ciclasa (Kebabian y Calne, 1979). En presencia de dopamina los receptores D1 activan dicha enzima incrementando los niveles de AMPc intracelulares mientras que los receptores D2 ejercen una influencia inhibitoria sobre esta enzima, y al mismo tiempo están ligados a otras vías de transducción de señales, como la activación de canales de K^+ , la inhibición de canales de Ca^{2+} y la hidrólisis de fosfatidilinositol (Vallar y Meldolesi, 1989).

En los inicios de la década del '90, con el uso de herramientas de clonado molecular, se reveló la existencia de los 5 subtipos de receptores de dopamina que hoy se conocen. El D2R fue el primer receptor dopaminérgico clonado a partir de una biblioteca de ADN copia de cerebro de rata (Bunzow *et al.*, 1988), seguido de su ortólogo en humanos (Grandy *et al.*, 1989). Posteriormente, se clonaron el receptor D1 de rata y humano (Zhou *et al.*, 1990), el receptor D3 de rata y humano (Sokoloff *et al.*, 1990), el receptor D4 humano (Van Tol *et al.*, 1991) y el receptor D5 de rata y humano (Sunahara *et al.*, 1991; Tiberi *et al.*, 1991). El análisis estructural, bioquímico y farmacológico demostró que estos receptores dopaminérgicos pertenecían a una de las dos categorías inicialmente descritas según su acción sobre la adenilato ciclasa (Missale *et al.*, 1998). La clasificación actual de los receptores se basa en la estructura genómica, la secuencia aminoacídica, el acoplamiento a segundos mensajeros y el perfil farmacológico (Tabla 1; Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

Subtipo Nombre	"tipo D1" DRD1 DRD5		DRD2	"tipo D2" DRD3	DRD4
Intrones	0	0	6	5	3
Variantes de splicing	-	-	D2S, D2L	D3S, D3L	NO
Número de aminoácidos	446	477	414,443	400	387
Acoplamiento a proteína G	Gas, Gaolf	Gas, Gaq	Gai, Gao	Gai, Gao	Gai, Gao
Agonistas específicos	Fenoldopam, SKF-38393, SKF-81297		Bromocriptina, pergolida, cabergolina, ropinirola	7-OH-DPAT, pramipexole, rotigotine, (+)PD-128907	A-412997, ABT-670, PD-168,077
Antagonistas específicos	SCH-23390, SCH-39166, SKF-83566		Haloperidol, spiperona, racloprida, sulpirida, risperidona	Nafadotride, GR 103,691, GR 218,231, SB-277011A	A-381393, FAUC 213, L-745,870, L-750,667

Tabla1. Clasificación y características de los receptores dopaminérgicos humanos. Datos de Beaulieu y Gainetdinov (2011).

2.2. Estructura génica de los receptores

Los receptores "tipo D1" y "tipo D2" difieren en su estructura génica, principalmente por la presencia o ausencia de intrones en su unidad transcripcional. Los receptores D1 y D5 carecen de intrones en su región intragénica mientras que los genes que codifican para los "tipo D2" contienen múltiples intrones, lo cual posibilita la existencia de transcritos alternativos. El gen del D2R contiene seis intrones y se observó que la inclusión de un exón alternativo de 87 pares

de bases entre los intrones 4 y 5 genera dos isoformas predominantes del receptor, denominadas D2S (corta) y D2L (larga) (Giros *et al.*, 1989; Monsma *et al.*, 1989). La presencia del exón extra produce una adición de 29 aminoácidos en el tercer *loop* intracelular. El receptor D3 posee cinco intrones y, si bien se describieron transcritos alternativos, aún no han sido estudiados en detalle (Giros *et al.*, 1991). El receptor D4, que posee tres intrones, no ha mostrado variantes de *splicing* pero si una gran cantidad de variantes polimórficas conteniendo repeticiones de 48 pares de bases en el tercer *loop* citoplasmático observándose hasta 11 repeticiones (Van Tol *et al.*, 1992). Los receptores de dopamina D1 y D5 poseen una identidad de secuencia aminoacídica del 80%. Los receptores D3 y D4 comparten una identidad de secuencia del 75 y 53% con el receptor D2, respectivamente. Los receptores “tipo D1” tienen un tercer *loop* intracelular corto y los “tipo D2”, por el contrario uno largo, característica típica de receptores acoplados a proteína Gs y Gi, respectivamente. Por otro lado, mientras que los dominios amino terminales son de un tamaño similar entre los cinco receptores, el dominio carboxilo terminal de los receptores “tipo D1” es siete veces mayor que el de los receptores “tipo D2” (Missale *et al.*, 1998).

2.3. Función de los receptores

La función más estudiada y comprendida de la dopamina en el cerebro es su participación en la actividad locomotora actuando principalmente sobre los receptores D1, D2 y D3 (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Missale *et al.*, 1998), localizados en neuronas presentes en los circuitos de los ganglios de la base donde la dopamina modula el control fino de los movimientos. Los receptores D4 y D5 poseen niveles de expresión moderados en las regiones motoras primarias del cerebro y su papel en la actividad motora se considera secundario (Missale *et al.*, 1998; Rondou *et al.*, 2010).

Los receptores D1 y D3 se encuentran exclusivamente en las neuronas postsinápticas, en cambio el D2 también se encuentra en las neuronas dopaminérgicas donde cumple un papel de autorreceptor. Los autorreceptores presinápticos proveen un mecanismo de retroalimentación negativa en respuesta a los cambios de los niveles extracelulares del neurotransmisor. La activación de los receptores “tipo D2” presinápticos causa una disminución en la liberación de dopamina que resulta en una menor respuesta locomotora, en cambio la activación de los receptores D2R postsinápticos produce un aumento en la locomoción. Estudios recientes en nuestro laboratorio demostraron que el autorreceptor D2 controla la frecuencia de disparo, la síntesis y liberación de dopamina (Bello *et al.*, 2011). Los receptores D1, D2 y D3, también se encuentran implicados en los mecanismos de refuerzo y recompensa, siendo de elevado interés

el estudio de los procesos fisiopatológicos involucrados en la adicción y abuso de drogas (Koob y Volkow, 2010; De Mei *et al.*, 2009; Missale *et al.*, 1998). Los receptores D1 y D2, presentes en la corteza prefrontal se encuentran involucrados en los mecanismos de aprendizaje espacial (Rinaldi *et al.*, 2007). El hecho de que la mayoría de los antipsicóticos bloquean receptores D2 indica que este receptor cumple un rol crítico en las reacciones psicóticas observadas en la esquizofrenia, especialmente en los síntomas “positivos” como delirios y alucinaciones (Roth *et al.*, 2004; Snyder *et al.*, 1970). Otras funciones conductuales tales como el afecto, la atención, la impulsividad, la toma de decisiones, el aprendizaje motor, el sueño, las conductas reproductivas y la regulación de la ingesta también son modificadas por estimulación o bloqueo de receptores dopaminérgicos, pero los mecanismos de acción de la dopamina sobre estas funciones todavía no se conocen con detalle (Iversen y Iversen, 2007; Koob y Volkow, 2010; Missale *et al.*, 1998; Rondou *et al.*, 2010).

Los receptores de dopamina también median funciones fuera del cerebro. Se encuentran involucrados en la olfacción, la visión, la regulación de la liberación de prolactina en la hipófisis (por D2R), la secreción de renina en el riñón (por D1R), la secreción de aldosterona (por D2R), la función renal, la vasodilatación, y la motilidad gastrointestinal (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Iversen y Iversen, 2007; Missale *et al.*, 1998).

2.4. Los receptores dopaminérgicos y los circuitos de los ganglios de la base

Los núcleos de los ganglios basales se conectan entre sí formando un circuito complejo que recibe entradas desde la corteza para finalmente proyectar nuevamente información hacia otras áreas corticales (Figura 5) (Albin *et al.*, 1989). Los núcleos de llegada son el estriado y el NST que reciben aferencias de toda la corteza cerebral (incluyendo la corteza motora, sensorial, de asociación y límbica), del tálamo y del sistema límbico (principalmente la amígdala y el hipocampo). Estas conexiones están intermitentemente activas y utilizan el glutamato como neurotransmisor (Redgrave *et al.*, 1999), ejerciendo un efecto excitatorio sobre las neuronas estriatales (Calabresi *et al.*, 1996). Los núcleos de salida son la SNr y el GPi, donde se encuentran los cuerpos de neuronas GABAérgicas inhibitorias, tónicamente activas, que proyectan sobre el tálamo, el cual vuelve a proyectar hacia la corteza (Redgrave *et al.*, 1999).

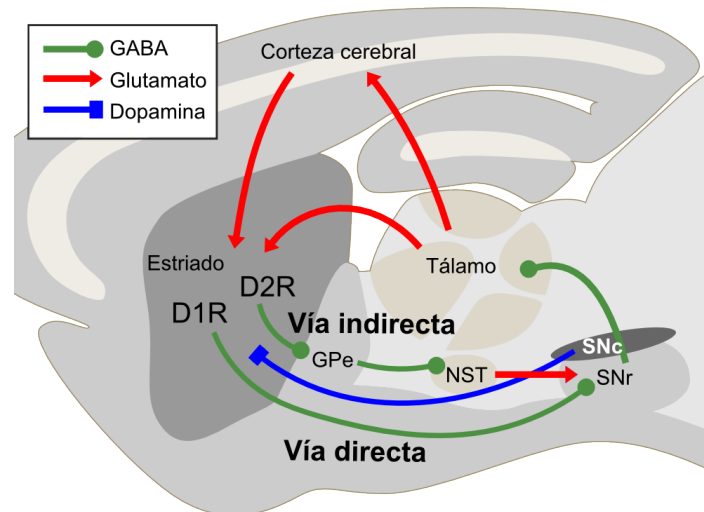


Figura 5. El circuito de los ganglios de la base. Las proyecciones glutamatérgicas excitatorias (rojo) hacia las neuronas estriatales provienen de neuronas en la corteza cerebral y del tálamo. Estas proyecciones se dirigen a MSNs estriofugales que contribuyen tanto a la vía directa (D1R) como a la vía indirecta (D2R). Las MSNs GABAérgicas (verde) que envían sus proyecciones a neuronas de la SNr y funcionan como intermediarias entre los ganglios de la base y el resto del cerebro. Según este modelo la vía directa tiene un efecto final excitatorio sobre la corteza motora. Por otro lado, las MSNs de la vía indirecta envían sus axones a neuronas del globo pálido externo (GPe) que luego proyectan sobre el núcleo subtalámico (NST) inhibiéndolo y éste estimula la SNr a través neuronas glutamatérgicas. Adaptado de Kravitz y Kreitzer (2012).

Las conexiones entre los ganglios basales están organizadas de manera tal que los impulsos fásicos puedan disminuir o aumentar el efecto inhibitorio tónico de los núcleos de salida sobre sus estructuras blanco. Para ello, existen dos circuitos internos. La vía directa, donde las MSNs del estriado proyectan directamente sobre los núcleos de salida (SNr/GPi) y desinhiben la inhibición tónica sobre el tálamo. Y la vía indirecta, donde las MSNs proyectan sus axones hacia el GPe, que inhibe tónicamente al NST. El NST estimula a los núcleos de salida, que terminarán aumentando su inhibición sobre el tálamo (Figura 5).

Una aferencia estriatal de gran relevancia está constituida por las fibras dopaminérgicas provenientes de la SNc (vía nigroestriatal), que modulan la información que llega desde la corteza (Smith y Bolam, 1990). El estriado también recibe la acción moduladora de las aferencias serotoninérgicas provenientes del rafe dorsal y noradrenérgicas del *locus coeruleus* (Gerfen y Wilson, 1996). Una de las diferencias más importantes entre las MSNs, aparte de sus proyecciones, es la expresión diferencial de receptores dopaminérgicos. Las MSNs que se encuentran en la vía directa expresan D1R y las que se encuentran en la vía indirecta expresan D2R. La dopamina, al liberarse en el estriado, actúa sobre ambos tipos de receptores (el D1R estimula la vía directa y el D2R inhibe la vía indirecta), en ambos casos favoreciendo el movimiento (Albin *et al.*, 1989; Graybiel, 2000). Este modelo establece entonces que la inervación dopaminérgica sobre el estriado conduce a un mismo resultado por ambos circuitos

que acúan de manera simultánea y coordinada regulando el tono inhibitorio sobre el tálamo y la consecuente liberación de glutamato en la vía tálamo-cortical.

2.5. Expresión de los receptores dopaminérgicos

Los receptores de dopamina tienen patrones de expresión extensos tanto en el cerebro como en la periferia. En el cerebro, el receptor D1 tiene niveles de expresión elevados en las áreas nigroestriatales, mesolímbicas y mesocorticales, como el núcleo estriado, el núcleo *accumbens*, la SNr, el bulbo olfatorio, la amígdala, y la corteza frontal. Niveles bajos de D1R se han observado en hipocampo y en áreas talámicas e hipotalámicas. El D5R tiene niveles de expresión bajos en varias regiones del cerebro, como las neuronas piramidales de la corteza prefrontal, la corteza entorrinal, la SN, el hipotálamo, el hipocampo y el giro dentado. Niveles muy bajos de este receptor también han sido observados en las MSNs del núcleo caudado y el núcleo *accumbens* (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Missale *et al.*, 1998). Sin bien se observan niveles elevados del receptor D1 en la SNr y en el núcleo entopeduncular, no se halla ARNm en estas áreas dado que el receptor está presente en las proyecciones de neuronas GABAérgicas ubicadas en el núcleo estriado que llegan hasta estas áreas (Missale *et al.*, 1998).

El D2R ha sido encontrado principalmente en el estriado, el tubérculo olfatorio, y el núcleo *accumbens* (Bouthenet *et al.*, 1991; Jackson y Westlind-Danielsson, 1994), donde se expresa en neuronas GABAérgicas que coexpresan encefalinas (Le Moine y Bloch, 1995). También se logró identificar ARNm del D2R en inter neuronas colinérgicas estriatales y en la corteza prefrontal cingulada, temporal y entorrinal, en el *septum*, la amígdala, y el hipocampo (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; Weiner *et al.*, 1991). En el hipotálamo, SNc y VTA, se encuentran neuronas dopaminérgicas que expresan autorreceptores D2R (Bouthenet *et al.*, 1991; Meador-Woodruff, 1989; Weiner *et al.*, 1991).

El receptor de dopamina D3 tiene un patrón de distribución más limitado, los máximos niveles de expresión se observan en las áreas límbicas como el núcleo *accumbens*, el tubérculo olfatorio y las islas de Calleja (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Missale *et al.*, 1998). También se observan bajos niveles en el estriado, la SNc, el VTA, el hipocampo, el *septum* y la corteza. El receptor de dopamina D4 posee bajos niveles de expresión en el cerebro, observándose principalmente en la corteza frontal, la amígdala, el hipocampo, el hipotálamo, el globo pálido, SNr, y el tálamo (Missale *et al.*, 1998; Noain *et al.*, 2006; Rondou *et al.*, 2010). Los receptores D1, D2, y D4 también se observan en retina y el D2R presenta niveles elevados en la hipófisis. En la periferia, todos los subtipos de receptores dopaminérgicos han sido observados en

diferentes proporciones en el riñón, las glándulas adrenales, los ganglios simpáticos, el tracto gastrointestinal, los vasos sanguíneos y el corazón (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Iversen y Iversen, 2007; Missale *et al.*, 1998).

3. Regulación de la expresión génica

Los organismos multicelulares necesitan un control preciso de su expresión génica, tanto durante el desarrollo como en la vida posnatal. Si bien todas las células poseen el mismo material genético cada tipo celular expresa un subconjunto limitado de genes que determina el grado de especialización de cada sistema fisiológico. El código transcripcional, conocido también como segundo código genético, establece los límites espacio-temporales, y cuantitativos, de la expresión de cada gen.

En metazoos la transcripción se encuentra controlada por la acción integral de una variedad de elementos regulatorios en *cis*; algunos de los cuales se encuentran cercanos al sitio de inicio de la transcripción (TSS), como los elementos proximales al promotor (Lenhard *et al.*, 2012) y otros componen módulos distales, entre los que se incluyen los *enhancers* (Bulger y Groudine, 2011; Levine, 2010), silenciadores (Petrykowska *et al.*, 2008; Vokes *et al.*, 2008) y aisladores (Gaszner y Felsenfeld, 2006).

Los *enhancers* son elementos de ADN capaces de amplificar fuertemente la eficiencia transcripcional de un gen vecino. Típicamente tienen una longitud de unos pocos cientos pares de bases (pb) y necesitan reclutar factores de transcripción (FT) específicos para ejercer su efecto regulatorio. Durante el desarrollo embrionario, y en cada tejido del organismo adulto, los diferentes tipos celulares expresan un subconjunto distinto de FTs dando lugar a un único código combinatorio capaz de ser interpretado por las regiones regulatorias de ADN para finalmente determinar cuándo un gen dado se transcribirá, o no, en un tipo celular particular (Rubinstein y de Souza, 2013). Si bien la mayoría de los *enhancers* parece encontrarse en las cercanías de los genes que controlan, algunos *enhancers* han sido identificados más allá de 1 Mb del TSS (Krivega y Dean, 2012). Mediante la formación de estructuras secundarias y terciarias dinámicas la cromatina adquiere conformaciones flexibles que permiten que dos regiones distales se encuentren en proximidad física (*looping* de ADN), como ha sido descrito que ocurre entre *enhancers* distales y promotores proximales al TSS (Visel *et al.*, 2009a). Para que este fenómeno ocurra es necesario un cambio en la organización espacial de la cromatina, proceso en el cual generalmente participan lamininas (Kind y van Steensel, 2010), y son

necesarias proteínas específicas, como las cohesinas, el complejo *Mediator* (Kagey *et al.*, 2010) y CTCF (Ong y Corces, 2014).

3.1. Control modular de la transcripción

Los genes con patrones de expresión complejos han mostrado tener una gran cantidad de *enhancers*, cada uno de los cuales dirige la expresión a un tipo celular y/o en un momento específico. Esta organización modular permite que cada *enhancer* controle la expresión génica con un dominio espacio-temporal estricto, de forma independiente a las demás regiones regulatorias. Por ejemplo, el gen *sonic hedgehog* (*Shh*), que codifica un ligando morfógeno, posee al menos 6 *enhancers* que controlan su expresión en diferentes regiones del tubo neural (Jeong *et al.*, 2006), como también un *enhancer* distal que dirige la expresión en la región apical de las extremidades durante su desarrollo (Lettice *et al.*, 2003; Sagai *et al.*, 2005). En el laboratorio del Dr. Rubinstein, durante el estudio de *Pomc*, se observó que los *enhancers* neurales distales nPE1 y nPE2 son suficientes para dirigir la expresión del gen en las neuronas hipotalámicas, mientras que el *enhancer* distal DPE y el proximal PPE dirigen la expresión de *Pomc* a la hipófisis (Figura 6; Rubinstein y de Souza, 2013).

Cada territorio espacio-temporal de expresión puede estar gobernado por más de un *enhancer* que actúan concertadamente de forma sinérgica o aditiva, como se ha demostrado recientemente para los *enhancers* neuronales de *Pomc* nPE1 y nPE2 (Lam *et al.*, 2015). Este fenómeno fue identificado inicialmente en genes de desarrollo de la mosca *Drosophila melanogaster* (Hong *et al.*, 2008; Frankel *et al.*, 2010; Barolo, 2012) y el grupo de Mike Levine propuso denominar *enhancer* primario al más proximal al gen y secundario o “*shadow enhancer*” al más lejano (Hong *et al.*, 2008). Esta terminología, sin embargo, no resulta conceptualmente del todo apropiada porque estudios funcionales *in vivo* demostraron que los *enhancers* más distales cumplen roles primordiales en la transcripción de un gen, y no secundarios o “en las sombras”, como ha sido demostrado para *enhancers* distales de los genes *Shh* (Sagai *et al.*, 2005), *atonal 7* (Ghiasvand *et al.*, 2011) y *Pomc* (Lam *et al.*, 2015). La existencia de superposiciones funcionales de los *enhancers* no se encuentra restringida a los genes de desarrollo. En el caso de *Pomc*, por ejemplo, los *enhancers* nPE1 y nPE2 son capaces de dirigir la expresión de genes reporteros, y del propio *Pomc* a la misma población de neuronas hipotalámicas (Figura 6) (Franchini *et al.*, 2011; Lam *et al.*, 2015). Incluso la expresión hipofisaria de *Pomc*, considerada por años dependiente de un *enhancer* proximal vecino al promotor, se encuentra regulada también por un *enhancer* distal adicional más recientemente identificado (Langlais *et al.*, 2011). Conocer el conjunto de *enhancers* célula-específicas de

cada gen permite generar un **mapa topotranscripcional**, como se observa en la Figura 6, en donde se representan las correspondencias entre cada *enhancer* y cada territorio de expresión. Estas correspondencias son no unívocas debido a que cada *enhancer* puede dominar más de un territorio de expresión y cada territorio de expresión puede ser dominado por más de un *enhancer*.

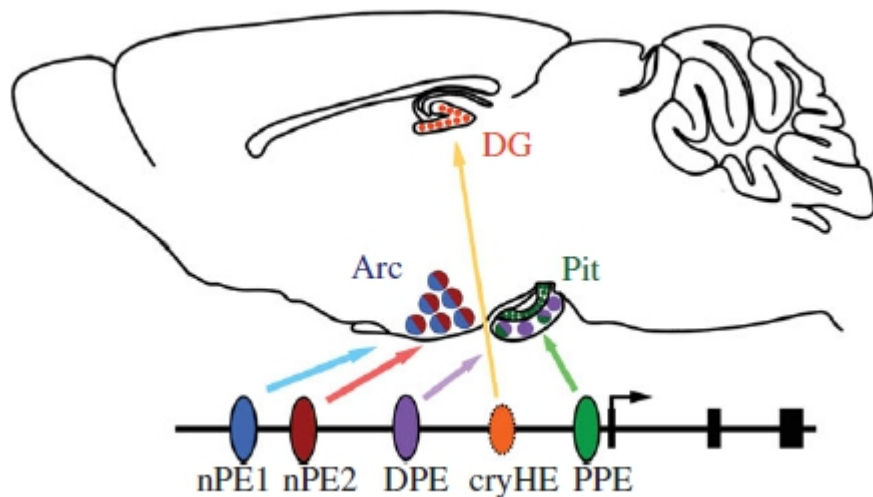


Figura 6. Esquema de la organización modular en la expresión de *Pomc*. Los *enhancers* neurales nPE1 y nPE2 controlan la expresión en el núcleo arcuato (Arc). El *enhancer* proximal PPE controla la expresión en melanotrofos y corticotrofos en la pituitaria (Pit), mientras que el *enhancer* distal DPE sólo es activo en corticotrofos. Un *enhancer* críptico (cryHE) dirige la expresión de transgenes en el giro dentado del hipocampo (DG) (Overstreet *et al.*, 2004). Figura adaptada de Rubinstein y de Souza, 2013.

Otros de los ejemplos que grafican la complejidad de la regulación transcripcional mediada a la distancia por los *enhancers* pueden observarse en trabajos realizados con el gen *Fgf8* y el *cluster* de genes *Hoxd*. En el caso del gen de ratón *Fgf8*, que codifica un péptido de señalización, se demostró que en una región de 220 kb la posición relativa de los *enhancers* en relación al TSS del gen es importante para la regulación fina de su patrón de expresión (Marinić *et al.*, 2013). Por otro lado, la actividad del *cluster* de genes *Hoxd*, que codifica proteínas de homeodominio involucradas en el desarrollo de los dígitos en mamíferos, se encuentra controlada por una serie de regiones regulatorias localizadas en un desierto génico de 600 kb formando lo que los autores denominaron un archipiélago regulatorio (Figura 7; Montavon *et al.*, 2011). Cuando los genes *Hoxd* se encuentran transcripcionalmente inactivos se pueden observar marcas epigenéticas típicas de *enhancers* activos en sólo algunas regiones regulatorias, o islas, pero para que los genes *Hoxd* se expresen en niveles apreciables en los dígitos en desarrollo todas estas islas deben estar activas interaccionando concertadamente. La

alteración en la estructura del archipiélago o la modificación de alguna de estas islas afecta la expresión correcta del gen (Figura 7).

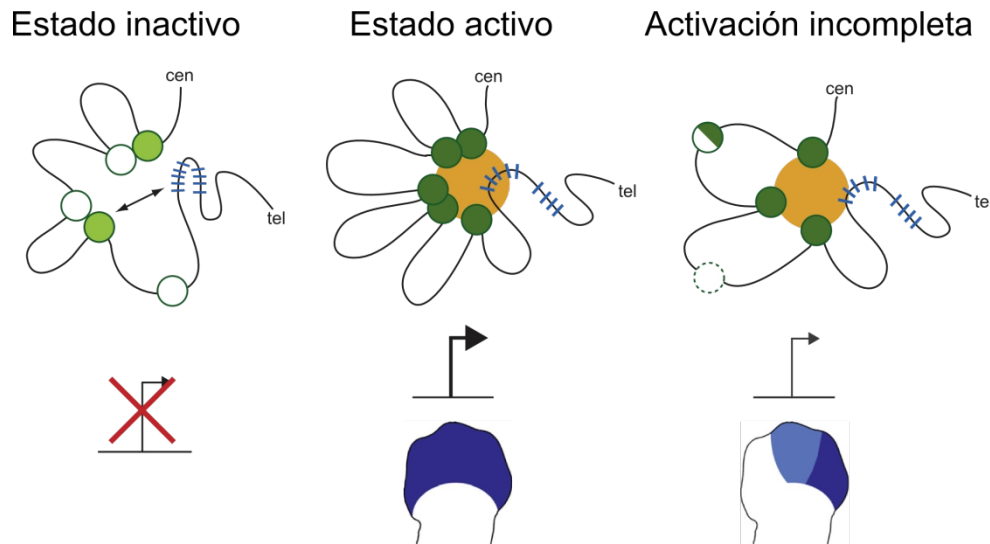


Figura 7. Modelo del archipiélago regulatorio de elementos regulatorios descrito para el gen de homeobox *Hoxd*. En el estado inactivo solo algunas islas regulatorias tienen marca de *enhancers* activos (Verde suave). Para que *Hoxd* se transcriba correctamente (estado activo) todas las islas deben estar activas e interactuar entre sí y con el promotor. La alteración en la estructura del archipiélago regulatorio o modificaciones en las islas puede afectar severamente la expresión del gen (activación incompleta); tel: telómero; cen: centrómero. Figura adaptada de Montavon *et al.*, 2011.

3.2. Arquitectura de *enhancers* transcripcionales

Los *enhancers* transcripcionales presentan varios sitios de unión a distintos factores de transcripción que mantienen entre sí una organización espacial más o menos flexible. A partir de estudios de disección funcional de varios *enhancers* se han propuesto distintos modelos de organización: el *enhanceosoma*, el letrero (*billboard*) (Arnosti y Kulkarni, 2005) y un tercer modelo intermedio denominado *TF collective* (Junion *et al.*, 2012).

El modelo del *enhanceosoma* surge del estudio del *enhancer* del interferón- β , en donde se observó que la unión de varios de FTs es necesaria para activar la transcripción del gen. Pequeños cambios en la secuencia que alteran la unión o la distancia de uno de estos FTs resultan en la inactivación del *enhancer*. En este modelo los FTs se unen de forma completamente cooperativa y con una organización muy precisa (Merika y Thanos, 2001). En los *enhancers* del tipo letrero la disposición y unión de los FTs se encuentra más relajada y flexible, de manera que la eliminación de un sitio de unión disminuye la actividad del *enhancer* pero no la bloquea completamente. Por ejemplo, el *enhancer* de la segunda banda del gen *even-skipped* en *D. melanogaster* tiene una organización de sitios de unión para los activadores

BICOID y HUNCHBACK, y los represores KRÜMPPEL y GIANT. Cuando los sitios de unión se encuentran mutados individualmente la función del *enhancer* no cambia drásticamente pero el dominio expresión del gen en la segunda banda cambia en intensidad y tamaño (Arnosti *et al.*, 1996). Un tercer modelo de organización de *enhancers* se propuso a partir de un estudio de genes que participan en el desarrollo del corazón, conocido como *TF collective* (Junion *et al.*, 2012). Según este modelo, los FTs operan en el *enhancer* uniéndose cooperativamente en una forma relativamente laxa, de manera que algunos sitios de unión pueden estar ausentes, pero igualmente el FT que corresponde puede unirse al *enhancer* vía interacción proteína-proteína con los demás FTs, y así finalmente producir la activación del gen. Si bien estos modelos resultan adecuados en sus respectivos sistemas de estudios, es esperable que la arquitectura que permite el correcto funcionamiento de los *enhancers* se encuentre determinada por un amplio espectro de posibilidades.

3.3. Modificaciones de la cromatina

La actividad de *enhancers* de genes que se expresan durante el desarrollo embrionario puede sufrir cambios progresivos desencadenados por modificaciones en las concentraciones relativas de los FTs activadores y represores y también por remodelación de la propia cromatina (Krysinska *et al.*, 2007; Tagoh *et al.*, 2004). Además, el acceso de los FTs a los *enhancers* depende de la ubicación relativa de los nucleosomas en la cromatina. Se ha descrito que para la ocupación de motivos de baja afinidad, el desplazamiento de los nucleosomas y, en algunos casos, la remodelación de la cromatina son procesos claves para que ocurra la unión de los FTs (Buck y Lieb, 2006). Un ejemplo de este tipo de regulación es la mediada por los FTs pioneros, que pueden interaccionar con secuencias de ADN que son inaccesibles para otros FTs y reclutar complejos proteicos remodeladores de la cromatina, que se encargan de reposicionar los nucleosomas para permitir la llegada de otros FTs específicos capaces de transactivar al gen (Zaret y Carroll, 2011). Las modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas que forman parte de los nucleosomas juegan, a su vez, papeles claves en la accesibilidad de los FTs y actividad de los *enhancers*. Estudios de los últimos años demuestran que algunas modificaciones específicas en aminoácidos de histonas pueden ser detectadas en promotores activos o inactivos, y en la región codificante de genes que están siendo activamente transcritos. Por ejemplo, la monometilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27) está relacionada con actividad génica, así como las monometilaciones en H3K9, H4K20, H3K79, y H2BK5 (Barski *et al.*, 2007). En cambio, las trimetilaciones en H3K27, H3K9 y H3K79 están relacionadas con represión transcripcional (Barski *et al.*, 2007). Por su parte, la monometilación

de la H3K4 y la acetilación en H3K27 permiten detectar *enhancers* activos (Creyghton et al., 2010) mientras que la trimetilación de la H3K4 sirve para predecir eficientemente promotores activos (Heintzman et al., 2007, 2009).

3.4. *Enhancers* en enfermedades (*enhancer*-opatías)

A pesar de la gran cantidad de desórdenes monogénicos conocidos causados por mutaciones en las regiones codificantes, el efecto de mutaciones en secuencias no codificantes ha sido muy poco estudiado. Sin embargo, algunos estudios mostraron que las variaciones en los *enhancers* distales que existen en el genoma humano pueden producir enfermedades (Visel et al., 2009a). Por ejemplo, las talasemias son patologías debidas a un desequilibrio en la relación entre α -globina y β -globina en la conformación de la hemoglobina presente en los glóbulos rojos. A través del mapeo y la secuenciación de regiones codificantes y no codificantes en los genes de globina de individuos talasémicos se descubrió que estos desequilibrios, en ciertos casos, obedecen a mutaciones en *enhancers* distales que modifican los niveles relativos de expresión de los genes de globina (Kioussis et al., 1983; Semenza et al., 1984). Otro ejemplo interesante es el *enhancer* MFCS1 del gen *Shh*, localizado aproximadamente a 1 Mb del TSS dentro del intrón de un gen vecino, y cuya remoción en ratones produce una severa disminución en el tamaño de las extremidades (Sagai et al., 2005). Mutaciones en este *enhancer* están asociadas con la polidactilia (Furniss et al., 2008; Lettice et al., 2003). Estos ejemplos revelan la importancia potencial de los *enhancers* en patologías genéticas que, sumados a nuevos casos identificados en los últimos años han derivado en la incorporación del término *enhanceropatía* (Smith y Shilatifard, 2014). El aumento exponencial de nuevos polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en regiones no codificantes del genoma humano, permitió extender las asociaciones entre polimorfismos particulares con variaciones en niveles de expresión de genes y su posible vinculación con enfermedades de base genética (Cookson et al., 2009; Draaken et al., 2015).

3.5. Identificación de *enhancers* y sus funciones

Hasta el advenimiento de la genómica comparada, ocurrida en los últimos 10 años, la identificación de *enhancers* ha resultado más dificultosa que la identificación de regiones codificantes (Visel et al., 2009a) debido a que su localización, *a priori* impredecible, puede estar en secuencias flanqueantes más o menos distales, en secuencias intrónicas e incluso dentro de unidades transcripcionales de genes vecinos.

A pesar de estas complicaciones, grandes esfuerzos se realizaron para identificar *enhancers* utilizando análisis delecionales en cultivos celulares o en ratones transgénicos como, por ejemplo, en el descubrimiento de los *enhancers* neuronales de *Pomc* en este laboratorio (Young et al., 1998; de Souza et al., 2005). El progreso de los distintos Proyectos Genoma y la anotación de las secuencias en bases de datos públicas facilitó la identificación de *enhancers* permitiendo análisis genéticos comparativos, (*footprinting* filogenético), que detectan secuencias conservadas dentro de regiones no codificantes (Bejerano et al., 2004; Pennacchio et al., 2006). Los análisis funcionales iniciales realizados en ratones o peces transgénicos demostraron que cerca de la mitad de secuencias humanas altamente conservadas en mamíferos tienen actividad de *enhancers* durante el desarrollo embrionario (Pennacchio et al., 2006; Visel et al., 2008). Si bien la identificación de *enhancers* a través del estudio de conservación de las regiones no codificantes es efectiva, este sistema tiene algunas limitaciones. Una gran cantidad de regiones conservadas analizadas en ratones transgénicos no mostraron actividad *enhancer* posiblemente porque fueron analizados en estadios del desarrollo discordantes con su actividad o, simplemente, por ser regiones de ADN conservadas que cumplen otro tipo de función como, por ejemplo, codificar para ARNs pequeños. Por otra parte, varios estudios fortalecen la idea de que una cantidad importante de *enhancers* muestran baja o ninguna conservación entre especies (Blow et al., 2010; Schmidt et al., 2010), lo que limita su detección por métodos bioinformáticos.

Algunas de estas complicaciones han sido resueltas utilizando métodos más novedosos que explotan la secuenciación masiva de nueva generación en combinación con técnicas de inmunoprecipitación cromatínica con anticuerpos (ChIP-seq) que reconocen marcas epigenéticas asociadas a *enhancers* activos. Esta metodología posee la ventaja de ser independiente de la conservación de la secuencia y también permite estudiar directamente el tejido deseado generando un catálogo genómico de potenciales *enhancers* específicos. Las marcas más comúnmente estudiadas para identificar *enhancers* incluyen p300 (Visel et al., 2009b), H3K27ac (Creyghton et al., 2010) y H3K4me1 (Heintzman et al., 2007, 2009). También el mapeo de las regiones sensibles a ADNasa I ha probado ser efectivo en la identificación de *enhancers* (Dorschner et al., 2004). También, se ha observado que *enhancers* activos son transcritos produciendo ARN no codificantes largos (Kim et al., 2010b). El conjunto de estas herramientas ha resultado ser útil en la identificación de *enhancers* y su validación tanto *in vitro* (Dorschner et al., 2004; Villar et al., 2015) como *in vivo* (Visel et al., 2009b). La Figura 8 resume estos conceptos mostrando cómo se observaría el entorno génico vinculado a la regulación de su transcripción.

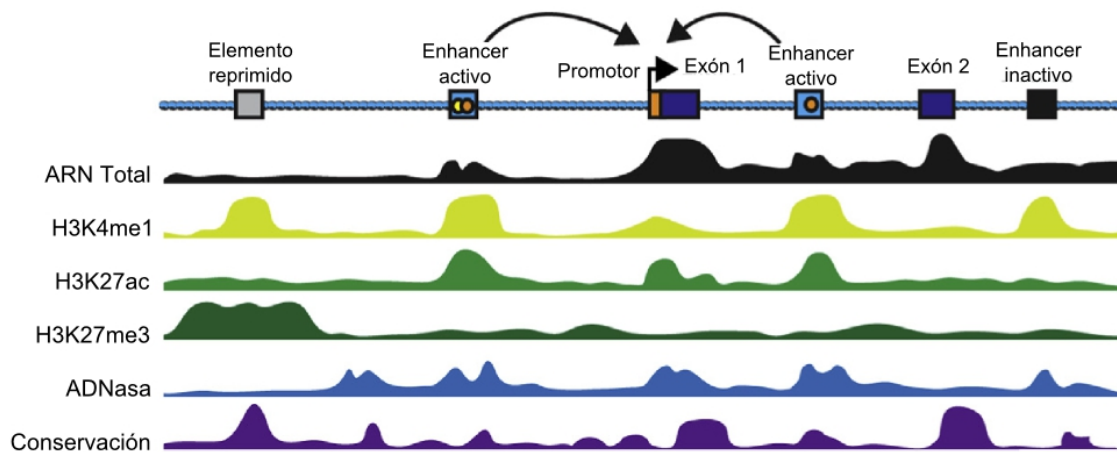


Figura 8. Entorno epigenético en la regulación transcripcional. Esquema tipo pista donde se muestran diferentes señales asociadas a los elementos que controlan la transcripción de un gen hipotético en un tejido determinado. (Adaptado de Nord *et al.*, 2015).

Finalmente, si bien existe una correlación entre los patrones de modificaciones cromatínicas y los estados de actividad, todavía no se ha reportado ninguna firma molecular específica y definitiva que capture exactamente la funcionalidad de los *enhancers* (Nord *et al.*, 2015; Pennacchio *et al.*, 2013).

3.6. ENCODE: La enciclopedia de elementos regulatorios de ADN

El proyecto ENCODE (*"The Encyclopedia of DNA Regulatory Elements"*) se creó con el propósito de proveer información transcripcional del genoma humano. Mediante la utilización de métodos de análisis masivos pretende identificar y catalogar los elementos funcionales codificados en el genoma humano. En su fase piloto, 35 grupos produjeron más de 200 sets de datos experimentales y computacionales concentrando el análisis en 30 Mb, el 1 % del genoma humano, utilizando varias líneas celulares humanas donde se estudiaron las regiones transcritas, las regiones codificantes, sitios de unión de factores de transcripción, la estructura cromatínica, sitios de metilación del ADN, polimorfismos, replicación, y estudios comparativos (Birney *et al.*, 2007). Algunos de estos ensayos incluyen el estudio de la estructura de la cromatina (FAIRE, ADNasa I), inmunoprecipitaciones de la cromatina con anticuerpos contra histonas modificadas (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3 y otras) y contra diferentes proteínas asociadas a las regiones funcionales (como PolII y CTCF, MYC, y otras) (Birney *et al.*, 2007).

En esta fase del proyecto se observó que el genoma humano es transcrita pasivamente, ya que la mayoría de las bases puede ser asociada con un transcripto primario. Se detectó una

gran cantidad de transcritos no codificantes, muchos de los cuales solapan con regiones codificantes y otras que se creían parte de regiones transcripcionalmente silentes. También se identificó una gran cantidad de TSS, muchos de los cuales mostraron una estructura cromatínica y propiedades típicas de los promotores conocidos y secuencias regulatorias proximales a los TSS distribuidas simétricamente a ambos lados. Este estudio confirmó que el grado de accesibilidad de la cromatina y los patrones de modificación de histonas son muy buenos predictores de la presencia y actividad de TSS. Si bien el proyecto ENCODE generó una gran cantidad de datos que permitieron avanzar en el conocimiento de los mecanismos de acción de las regiones regulatorias, existen varias limitaciones en el uso de esta información para caracterizar los elementos activos en el cerebro debido a la baja representatividad de las líneas celulares y tipos de tejidos utilizados para realizar los ensayos (Nord *et al.*, 2015; Pennacchio *et al.*, 2013). No obstante, en las fases actuales del proyecto se está comenzando a incorporar cada vez más datos provenientes de análisis de diferentes tejidos, incluyendo también muestras provenientes de animales modelos como *D. melanogaster*, *C. elegans* y *M. musculus* (Ho *et al.*, 2014; Yue *et al.*, 2014), lo que permitirá estudiar el entorno epigenético y ayudará a predecir con más exactitud la función de los elementos genómicos en tipos celulares diversos.

4. Construcción de ratones transgénicos con BACs

Para entender los mecanismos que contribuyen a la formación y función de los distintos circuitos cerebrales resulta útil conocer los perfiles espacio-temporales de expresión de genes y la localización de sus productos proteicos más fundamentales en cada uno de los tipos celulares que integran. La capacidad de manipular genéticamente un grupo distintivo de neuronas en el cerebro permite visualizar y modificar selectivamente su actividad, aportando oportunidades únicas para estudiar y comprender sus mecanismos fisiológicos y regulatorios. Durante los últimos 15 años las técnicas de recombinación en cromosomas bacterianos artificiales (BACs) (Copeland *et al.*, 2001) permitieron generar ratones transgénicos capaces de expresar proteínas heterólogas en los mismos tipos celulares donde normalmente se expresa un gen de interés al estar bajo el control transcripcional de secuencias regulatorias distales presentes en fragmentos de ~ 200 kb (Gong *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2006; Miyoshi y Fishell, 2006; Pashos *et al.*, 2013; Sparwasser y Eberl, 2007). Debido a su utilidad como herramienta en esta Tesis comentaremos más en detalle sus particularidades y algunas de sus aplicaciones.

4.1. El proyecto GENSAT

Utilizando técnicas de recombinación en BACs y la generación de ratones transgénicos el proyecto GENSAT es el primer emprendimiento a gran escala que pretendió generar un mapa de expresión de aproximadamente 5000 genes activos en el sistema nervioso central. La creación de una enorme biblioteca de BACs recombinantes permitió desarrollar una valiosa colección de líneas de ratones BAC transgénicos capaces de coexpresar proteínas fluorescentes en las mismas neuronas donde se expresa el gen endógeno permitiendo, así, la realización de estudios anatómicos y fisiológicos impensados poco tiempo atrás.

A pesar de su tamaño relativamente grande (promedio de 200 kb) los BACs pueden ser secuenciados directamente y utilizados para microinyectar cigotas para la generación de ratones transgénicos. Una gran cantidad de bibliotecas genómicas de diferentes especies, incluyendo humano, ratón, rata y pez cebra, se encuentran almacenadas en BACs. Adicionalmente, existe una gran cantidad de métodos que utilizan metodologías de recombinación en *Escherichia coli* que permiten la rápida modificación de estos grandes fragmentos de ADN (Yang y Gong, 2005). Una de las mayores ventajas del uso de BACs para los estudios de transgénesis es la capacidad de estas construcciones para evitar efectos posicionales producidos por la integración al azar, permitiendo una expresión más fidedigna del transgén *in vivo*. Esto se debe en parte a que la mayoría de los genes tienen un tamaño menor a los 100 kb y una gran cantidad de los elementos que regulan su transcripción pueden encontrarse dentro de los límites del BAC. Las ventajas de este sistema se demostraron inicialmente con el gen *Zipro1*, un FT específicamente expresado en células granulares en cerebros postnatales (Yang *et al.*, 1997). En este trabajo diez líneas de ratones producidas con una construcción transgénica tradicional conteniendo 10 kb de la región promotora del gen seguida de *lacZ* mostraron expresión ectópica o la ausencia de expresión. Pero en cambio un BAC de 130 kb conteniendo a *Zipro1* modificado para expresar *lacZ* produjo la expresión del reportero en la población celular esperada (Yang *et al.*, 1997).

En su primera etapa, el proyecto GENSAT generó alrededor de 100 BACs diferentes, en donde los genes de interés se sustituyeron por el gen de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP), para la producción de ratones transgénicos. De esta manera se encontró que aproximadamente el 80 % de los eventos de transgénesis generan patrones de expresión coincidentes con los del gen endógeno y reproducibles (Gong *et al.*, 2003). Más recientemente, el proyecto GENSAT está produciendo un gran número de líneas transgénicas con BACs que dirigen la expresión de la recombinasa *Cre*. Estas cepas pueden ser combinadas con un gran

número de ratones transgénicos con sitios de recombinación *loxP*, y virus diseñados para expresarse en la presencia de *Cre* que permiten producir una manipulación genética con un control espacio-temporal más preciso. Hasta la actualidad el proyecto GENSAT ha generado y analizado más de 10.000 líneas transgénicas, muchas de las cuales se encuentran disponibles para la comunidad científica (Schmidt *et al.*, 2013).

4.2. El uso de BACs en la disección de los circuitos de los ganglios de la base

El desarrollo de la transgénesis en ratones con BACs que expresan genes reporteros, como EGFP o la proteína fluorescente roja (tdTomato), permitió a los investigadores identificar el nivel de segregación de los receptores D1 y D2 en las MSNs estriatales (Lobo *et al.*, 2006; Shuen *et al.*, 2008; Thibault *et al.*, 2013; Valjent *et al.*, 2009). Estos estudios demostraron convincentemente que las MSNs pueden ser separadas en dos principales subgrupos definidos por sus sitios de proyección y las proteínas que expresan, la vía estriadonigra (directa) y la vía estriadopálida (indirecta), previamente descritas. Además de estos dos subgrupos también existe una pequeña subpoblación de MSNs que expresan ambos receptores, que según se determinó es relativamente baja, entre el 5 y 15% en el estriado dorsal (Valjent *et al.*, 2009). En estos estudios la línea de ratones generada por el proyecto GENSAT y utilizada para identificar las neuronas D2R positivas (*Drd2*-EGFP) resultó de vital importancia para la disección molecular de los circuitos estriatales. El alto grado de colocación de EGFP con encefalina y la detección del ARN mensajero de *Drd2* en células separadas mediante FACS permitió validar la correcta expresión de EGFP en las MSNs de la vía indirecta (Figura 9; Lobo *et al.*, 2006). Debido a su importancia en los estudios vinculados con la fisiología del D2R, en esta Tesis utilizaremos estos ratones como herramienta para validar la expresión de los transgenes conteniendo las diferentes regiones regulatorias.

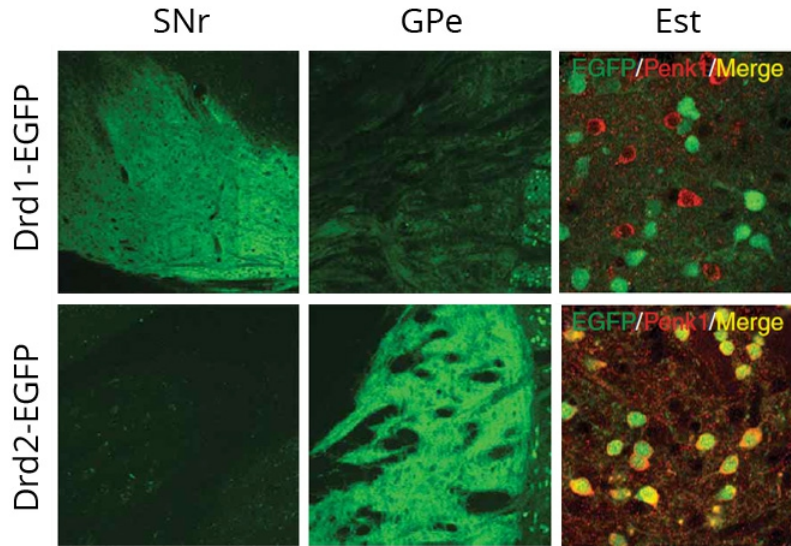


Figura 9. Expresión de EGFP por los BACs conteniendo las regiones regulatorias de *Drd1* y *Drd2*. La expresión de EGFP en la SNr el GPe y el núcleo estriado (Est) producida por los BACs reproduce los patrones esperados para los receptores D1 y D2. Adicionalmente, la colocalización en el estriado con encefalina (Penk1) en los ratones *Drd2*-EGFP, y no en ratones *Drd1*-EGFP, validan la correcta expresión en este tejido. Figura adaptada de Lobo *et al.*, 2006.

Como mencionamos anteriormente, el modelo clásico de los ganglios de la base plantea la existencia de dos circuitos, el directo que mediante su activación facilita el movimiento, y el indirecto que mediante su activación inhibe el movimiento. Sin embargo, este modelo no se había podido probar empíricamente en parte por las dificultades para acceder de manera directa y específica a cada uno de los circuitos. Estas complicaciones pudieron superarse recientemente a partir del desarrollo de la técnica de optogenética acoplada al uso de ratones BAC transgénicos. La rodopsina 2 del alga unicelular *C. reinhardtii* (*channelrhodopsin 2*; ChR2) es una proteína que ensambla un canal catiónico de membrana activable por luz azul (480 nm). En el 2005 por primera vez se expresó ChR2 en neuronas permitiendo su estimulación con luz azul (Boyden *et al.*, 2005) y en el 2010 esta metodología se utilizó para activar de manera independiente las ramas directa e indirecta del circuito extrapiramidal de los ganglios de la base (Kravitz *et al.*, 2010) en ratones que expresaban *Cre* bajo el control de un BAC conteniendo el *locus* del *Drd1* o del *Drd2* (Figura 10A). Así la estimulación bilateral con luz azul de la vía directa (BAC con *Drd1*-*Cre*) mostró una disminución en el tiempo de inactividad motora y un incremento en la actividad ambulatoria. En cambio, la estimulación con luz azul de la vía indirecta (BAC con *Drd2*-*Cre*) mostró una caída en la actividad ambulatoria y un aumento en el tiempo de inactividad motora (Figura 10B). Finalmente, mediante la utilización de un modelo de la enfermedad Parkinson en ratones, los autores sugieren que la estimulación específica de la vía directa podría ser un método efectivo para mejorar los síntomas de la enfermedad (Kravitz *et al.*, 2010).

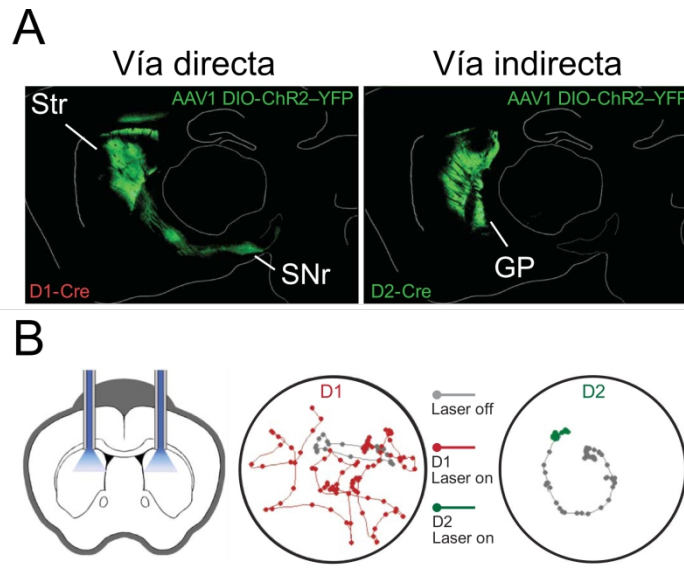


Figura 10. Activación independiente de las MSNs de la vía directa y de la vía indirecta mediante optogenética. A. Inyecciones estriatales de virus que expresan ChR2 en presencia de CRE en ratones transgénicos con BACs que contienen el gen *Drd1* (MSNs de la vía directa) o *Drd2* (MSNs de la vía indirecta) reemplazando su región codificante con el gen *Cre*. **B.** Mientras que la estimulación bilateral de la vía directa (D1R) produce un efecto hiperlocomotor (recorrido marcado en rojo), el mismo tipo de estimulación en la vía indirecta (D2R) produce un efecto hipolocomotor (recorrido marcado en verde). Adaptado de Kravitz *et al.*, 2010.

4.3. Los BACs y su utilidad en la búsqueda de *enhancers*

Debido a que los BACs permiten indagar grandes fragmentos de ADN genómico resultan de utilidad en la búsqueda y el análisis de elementos regulatorios de la transcripción. A pesar de las ventajas que tiene la generación de ratones transgénicos mediante BACs, la purificación y microinyección pronuclear de BACs requiere de cuidados adicionales en relación a los transgenes convencionales. Debido a su gran tamaño, los BACs son más propensos al daño mecánico complicando su purificación y almacenamiento por largos periodos de tiempo (Yang y Gong, 2005). Por su parte, para evitar efectos tóxicos la microinyección pronuclear de BACs debe realizarse a concentraciones mucho menores que la de los transgenes convencionales limitando las probabilidades de inserción en el ADN genómico. En esta Tesis Doctoral se utilizó por primera vez en el laboratorio del Dr. Rubinstein, y probablemente en la Argentina, la tecnología de BACs recombinantes para producir ratones transgénicos con el fin de evaluar el entorno genómico que rodea a *Drd2*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar y caracterizar *enhancers* que regulan la transcripción del gen del receptor de dopamina D2 (*Drd2*) en los distintos tipos celulares del cerebro y la hipófisis.

Objetivos particulares

1. Realizar estudios de expresión en ratones transgénicos de grandes fragmentos del locus de *Drd2* de ratón que incluyan regiones flanqueantes e intrónicas y comenzar a determinar el mapa topotranscripcional de expresión de *Drd2* en el cerebro y la hipófisis.
2. Identificar *enhancers* transcripcionales que regulan la expresión de *Drd2* en determinados tipos celulares a partir de la disección de las regiones halladas en el objetivo 1 mediante el uso combinado de herramientas bioinformáticas y ensayos de expresión en ratones transgénicos.
3. Utilizar los *enhancers* caracterizados en el objetivo 2 para dirigir la expresión de proteínas heterólogas a poblaciones definidas de neuronas de ratones transgénicos que sirvan como nuevos modelos para el estudio de circuitos fisiológicos en los que se expresa *Drd2*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Sesenta kilobases del locus de *Drd2* de ratón contienen elementos regulatorios necesarios para su expresión en cerebro e hipófisis

En el marco del proyecto GENSAT se generó un BAC recombinante conteniendo una región genómica de 217 kb y la secuencia codificante de la proteína reportera EGFP río arriba del codón de iniciación de la traducción de *Drd2* (construcción anotada como BX37), que en esta Tesis mencionaremos como *Drd2*-EGFP (Figura 11A). La línea de ratones S118, portadora del BAC *Drd2*-EGFP, ha sido extensamente utilizada por la comunidad científica en los últimos años dado que permite identificar neuronas con receptores D2 en distintos circuitos neuronales, tanto para su caracterización electrofisiológica en rodajas de cerebro *ex vivo*, como para estudios neuroanatómicos y de coexpresión con otros marcadores neuronales (Gong *et al.*, 2003; Lobo *et al.*, 2006; Matamales *et al.*, 2009; Shuen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006). En esta Tesis analizamos detalladamente el patrón espacial de expresión de EGFP en ratones S118 adultos y confirmamos que coincide con las áreas de expresión de *Drd2* reportadas en la literatura y en el Allen Brain Atlas (Figura 11B), lo cual sugiere que la región génica presente en el BAC BX37 contendría elementos fundamentales que regulan la transcripción de *Drd2*.

Para identificar potenciales *enhancers* transcripcionales en dicha región genómica de 217 kb, utilizamos como primera aproximación un análisis bioinformático de secuencias conservadas disponibles en el *Genome Browser* de la Universidad de Santa Cruz, California, EEUU. Tomando el genoma de referencia de ratón (ensamble NCBI/mm9), analizamos el panel de elementos conservados entre 20 mamíferos placentarios calculados a partir del programa PhastCons (Siepel *et al.*, 2005). Los elementos conservados son detectados utilizando modelos ocultos de Markov a partir de segmentos alineados mediante el programa Multiz (Blanchette *et al.*, 2004). Los elementos conservados detectados se pueden ordenar de acuerdo a un puntaje que toma valores entre 0 y 1000 dependiendo de la probabilidad de estar bajo selección purificadora o de estar conservado por azar.

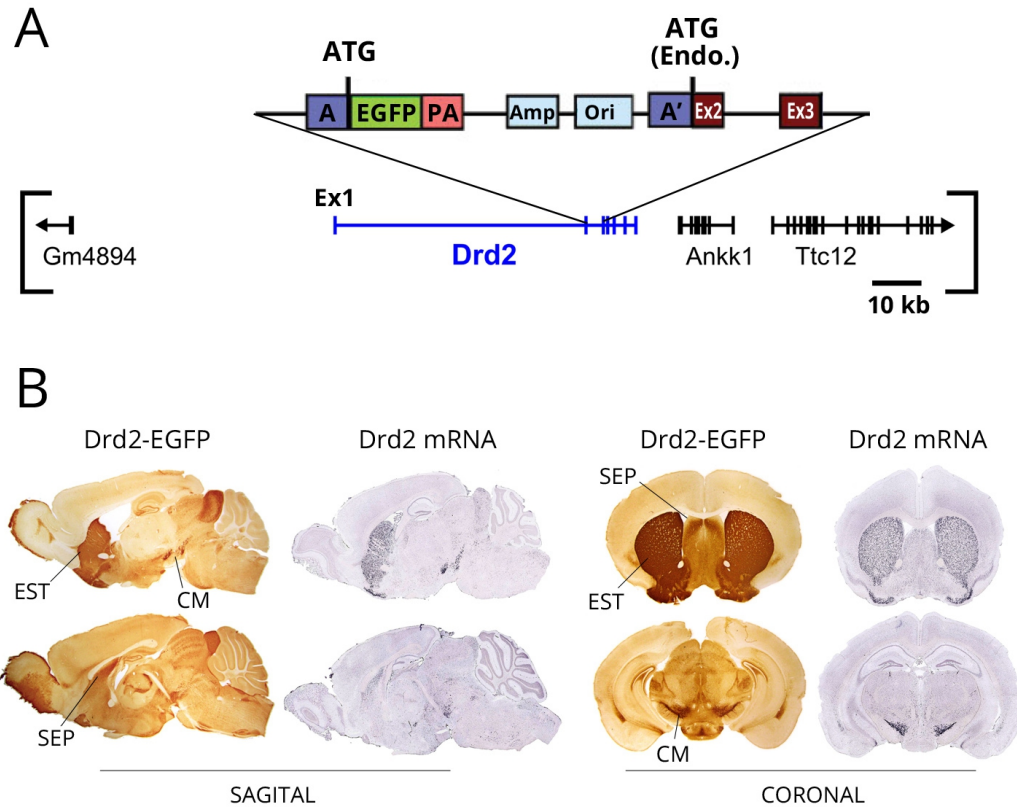


Figura 11. Expresión del BAC *Drd2*-EGFP y ARNm de *Drd2* en el cerebro. A. BAC BX37 de 217 kb que contiene a *Drd2* modificado por Gong *et al.* (2003) mediante ingeniería recombinante. El vector que contiene EGFP se recombinó antes del sitio de inicio de la traducción ATG endógeno (Endo.), la construcción final mantiene secuencias bacterianas de resistencia a ampicilina (Amp) y el origen de replicación R6Ky (Ori). B. Los patrones de expresión de EGFP en el cerebro de ratones *Drd2*-EGFP (BX37) (GENSAT) coinciden con los observados en el *Allen Brain Atlas* donde se detectan los niveles de ARNm de *Drd2* en cerebro de ratones (*Allen Institute*). Las áreas con mayor expresión de D2R corresponden al estriado dorsal y ventral (EST), el cerebro medio, y mediales (Abajo) donde se observa el Septum (SEP). SAGITAL: cortes sagitales de cerebro laterales (Arriba) donde se observa EST y cerebro medio, y mediales (Abajo) donde se observa el Septum (SEP). CORONAL: cortes coronales de cerebro anteriores (Arriba) donde se observa el SEP y el EST, y posteriores (Abajo) donde se observa el cerebro medio. Drd2-EGFP: inmunohistoquímica contra EGFP. Drd2 ARNm (*in situ*): Imágenes obtenidas a través de <http://www.brain-map.org/>.

De los 100 elementos más conservados entre mamíferos en la región genómica de 217 kb contenida en el BAC BX37 *Drd2*-EGFP, 60 se hallan en secuencias exónicas y 40 en fragmentos intergénicos o intrónicos. En la Tabla 2 se detallan los 24 elementos más conservados que no corresponden a exones ni al elemento conservado ubicado en el TSS de *Drd2*, ordenados según su posición relativa al TSS en el cromosoma. Cinco elementos conservados se encuentran en la región intergénica río arriba del gen *Drd2*, 10 se encuentran en el primer intrón de *Drd2*, 4 en la región intergénica río abajo del gen *Drd2* y 5 en intrones del gen *Ttc12*. Para facilitar la nomenclatura de las regiones conservadas asociamos cada uno de estos elementos conservados a la distancia aproximada en kb hasta el TSS. Mediante este

análisis, observamos una elevada densidad de elementos conservados en el primer intrón de *Drd2* que resalta su probable importancia en la regulación de la transcripción de gen.

Posición (NCBI37/mm9)	Puntaje (PhastCons)	Distancia a TSS (Kb)	Observaciones
chr9:49103384-49103492	503	-45	Intergénico 5'
chr9:49105545-49105576	386	-43	Intergénico 5'
chr9:49117715-49117773	408	-31	Intergénico 5'
chr9:49119420-49119504	352	-29	Intergénico 5'
chr9:49146636-49146765	548	-2	Intergénico 5'
chr9:49148590-49148834	480	0	Drd2 - Exón 1
chr9:49149565-49149630	419	+0.8	Drd2 - Intrón 1
chr9:49150966-49151022	458	+2.2	Drd2 - Intrón 1
chr9:49152424-49152479	399	+3.6	Drd2 - Intrón 1
chr9:49153331-49153466	533	+4.5	Drd2 - Intrón 1
chr9:49188910-49189106	618	+40	Drd2 - Intrón 1
chr9:49193786-49193965	556	+45	Drd2 - Intrón 1
chr9:49194494-49194608	516	+46	Drd2 - Intrón 1
chr9:49197673-49197695	341	+49	Drd2 - Intrón 1
chr9:49197722-49197872	564	+49	Drd2 - Intrón 1
chr9:49216217-49216271	413	+67	Intergénico 3'
chr9:49216725-49216858	569	+68	Intergénico 3'
chr9:49217490-49217565	457	+69	Intergénico 3'
chr9:49217577-49217636	467	+69	Intergénico 3'
chr9:49276705-49276775	437	+128	Intrón Ttc12
chr9:49277070-49277127	362	+128	Intrón Ttc12
chr9:49277658-49277693	348	+128	Intrón Ttc12
chr9:49279492-49279667	530	+131	Intrón Ttc12
chr9:49291505-49291620	474	+143	Intrón Ttc12

Tabla 2. Elementos conservados en mamíferos de la región genómica contenida en *Drd2*-EGFP. Se muestran los 24 elementos con mayor puntaje determinado por PhastCons que no corresponden a exones y el elemento conservado ubicado en el TSS (exón 1) de *Drd2*. Los datos se obtuvieron del *track* de elementos conservados en mamíferos placentarios (*Genome Browser*, mm9/Mouse, PhastCons *Placental Mammal Conserved Elements*, 30-way Multiz Alignment). Los elementos están ordenados según su posición en el cromosoma. La nomenclatura propuesta se refiere a la distancia en kb relativa al TSS (posición 0).

Considerando la amplia distribución de los posibles elementos regulatorios, como primera estrategia decidimos realizar delecciones en el BAC *Drd2*-EGFP y reemplazar la proteína reportera verde EGFP por la roja Tdimer2 (Td2), utilizando técnicas de recombinación en BACs. El patrón de expresión de los ratones *Drd2*-Td2 fue comparado con el de *Drd2*-EGFP. En la Figura 12A se muestra un esquema de estas construcciones, donde se señalan las posiciones de los elementos conservados según PhastCons de la Tabla 2 y su conservación entre mamíferos determinada por PhyloP, programa que permite observar la conservación absoluta

de cada sitio y brinda información adicional a PhastCons. En la primera delección eliminamos la región río abajo del exón 2 de *Drd2*, incluyendo la remoción de 9 de los 24 elementos conservados (Tabla 2). La construcción resultante, [-65/+55]*Drd2*-Td2, se expande 120 kb y abarca 65 kb río arriba (una región intergénica y una primera porción del gen *Gm4894*) y 55 kb río abajo del TSS de *Drd2* (el exón 1, el intrón 1 y el exón 2 de *Drd2* seguido de la secuencia que codifica Td2). En la segunda delección, realizada sobre la construcción anterior, generamos el BAC [-5/+55]*Drd2*-Td2 que contiene la región central de *Drd2*-EGFP (5 kb río arriba del TSS hasta 55 kb río abajo). En esta construcción eliminamos 60 kb en las que se hallan incluidos los primeros 4 elementos conservados listados en la Tabla 2. La construcción final contiene el primer intrón de *Drd2* que ocupa casi la totalidad del BAC y tiene 10 de los elementos más conservados (Tabla 2).

Con el fin de analizar la capacidad de los BACs [-65/+55]*Drd2*-Td2 y [-5/+55]*Drd2*-Td2 para dirigir la expresión en células en las que *Drd2* se expresa normalmente, generamos 2 líneas de ratones transgénicos con el primer BAC y 4 con el segundo. En la Figura 12B se muestran cortes sagitales de cerebro en campo claro a bajo poder que permiten observar que la expresión de Td2 es similar entre las dos construcciones. Se encontraron niveles abundantes de Td2 en el estriado dorsal y ventral, y en áreas en donde se hallan las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. En resumen, las dos líneas generadas con el BAC [-65/+55]*Drd2*-Td2 y las cuatro líneas generadas con el BAC [-5/+55]*Drd2*-Td2, expresaron la proteína reportera reproduciendo patrones muy similares a los observados en ratones *Drd2*-EGFP y al perfil de expresión de *Drd2* (Figura 12B; Figuras suplementarias 1 y 2).

La región del cerebro en la que observamos mayor expresión de Td2, tanto en extensión como en intensidad, corresponde al cuerpo estriado (Figura 12B), estructura subcortical localizada lateralmente en la región telencefálica. Ambas construcciones, [-65/+55]*Drd2*-Td2 y [-5/+55]*Drd2*-Td2, produjeron expresión de Td2 en el estriado dorsal (núcleo estriado) y el estriado ventral (núcleo *accumbens* y el tubérculo olfatorio) con intensidades similares y comparables a la observada para EGFP en ratones *Drd2*-EGFP (Figura 13). También, observamos la presencia de la proteína reportera en las fibras neuronales del globo pálido externo pero no en cuerpos celulares de esta región (Figura 13). Todos estos resultados fueron muy similares entre las distintas líneas transgénicas generadas.

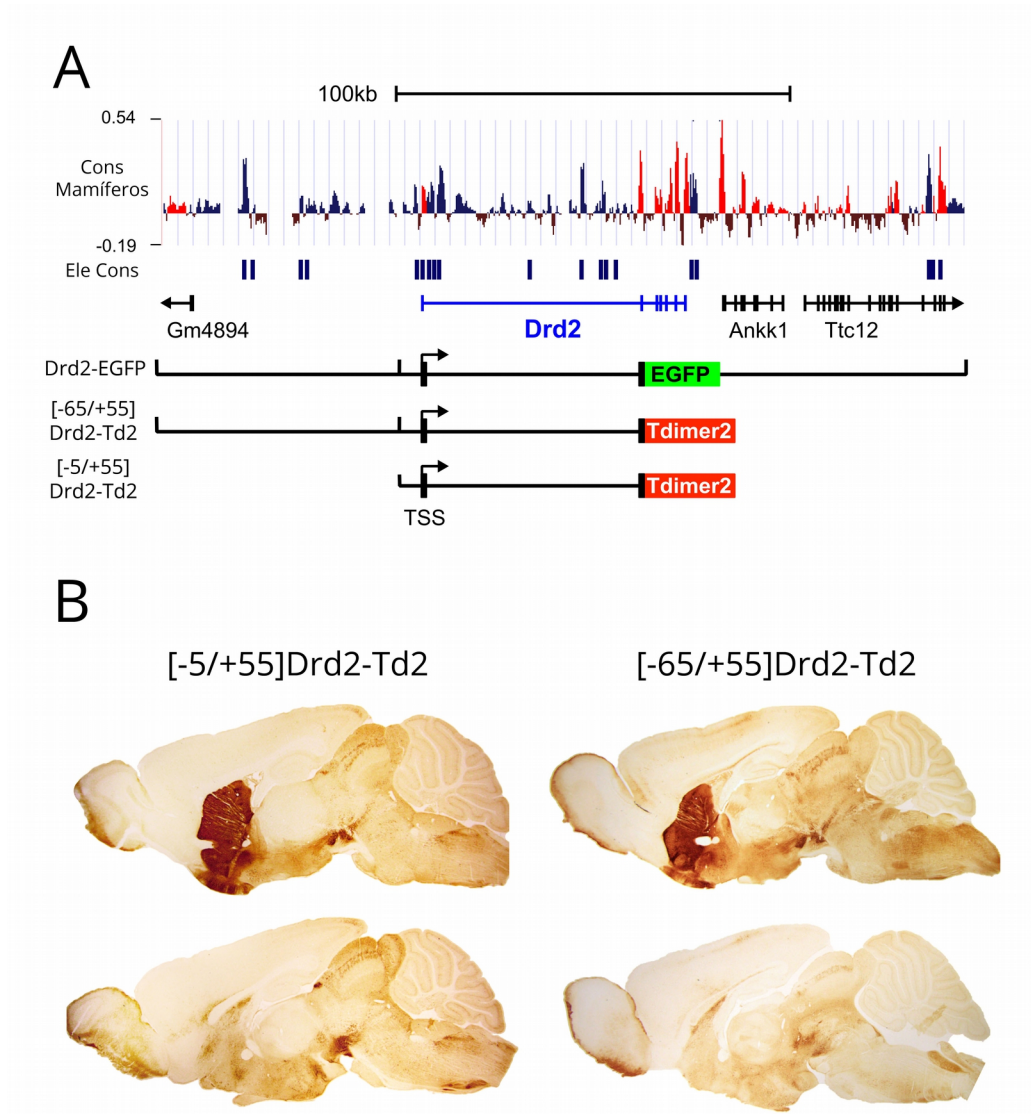


Figura 12. Las construcciones [-65/+55]*Drd2*-Td2 y [-5/+55]*Drd2*-Td2 derivadas del BAC *Drd2*-EGFP (BX37) generan los mismos patrones de expresión. A. Arriba: conservación medida por PhyloP de la región genómica delimitada por el BAC *Drd2*-EGFP; los picos de conservación de color rojo corresponden a exones de los genes hallados en la región y los picos de color azul corresponden a regiones intergénicas o intragénicas que potencialmente podrían actuar como *enhancers*. Ele Cons: elementos conservados de la Tabla 2. Abajo: esquemas de los BACs. **B.** Los cerebros de ratones [-5/+55]*Drd2*-Td2 y [-65/+55]*Drd2*-Td2 presentan la misma distribución de Td2, la marca inmunohistoquímica se observa tanto en el estriado como el cerebro medio y el *septum*.

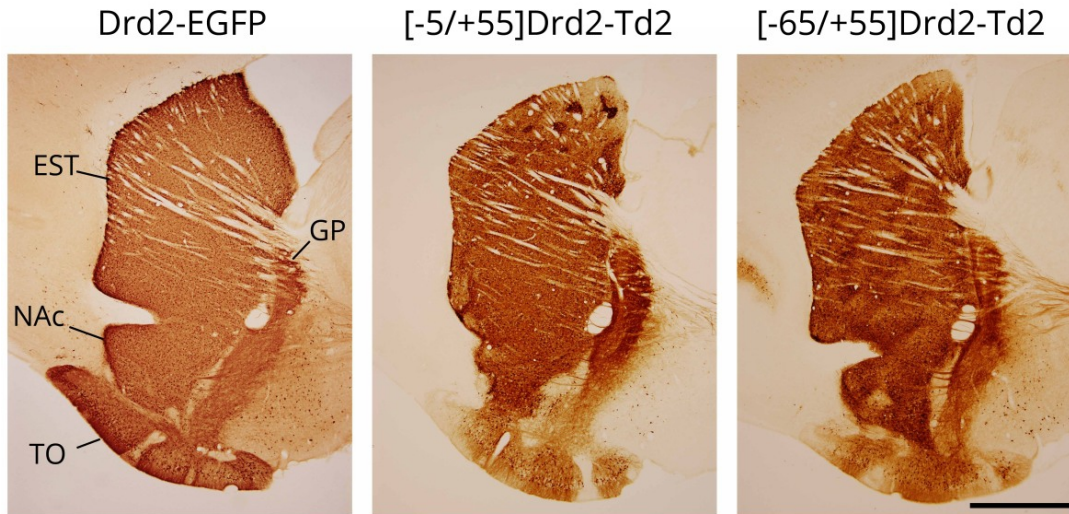


Figura 13. Expresión producida por los diferentes BACs en el estriado de ratones transgénicos. Cortes sagitales de cerebro comparando la expresión de las proteínas reporteras, reveladas por inmunohistoquímica con anticuerpos anti-EGFP (izquierda) o anti-Td2 (centro y derecha) en las regiones del núcleo estriado (EST), *accumbens* (NAc), tubérculo olfatorio (TO) y globo pálido (GP). Escala 1 mm.

Otra región de interés donde observamos expresión de Td2 corresponde al área dopaminérgica del cerebro medio. En la Figura 14 se muestra la expresión de las proteínas reportera EGFP y Td2 en la SNc, el VTA y el campo retrorubral. Td2 se distribuye en neuronas de las áreas dopaminérgicas A8, A9, A10 de igual manera a EGFP en cortes de cerebro de ratones *Drd2*-EGFP. Estos hallazgos fueron consistentes con los producidos por las demás líneas transgénicas.

Las neuronas del cerebro medio marcadas en los ratones transgénicos corresponderían a neuronas dopaminérgicas en donde el D2R funciona como autorreceptor limitando la liberación y la síntesis de dopamina y la actividad neuronal (Rice *et al.*, 2011). Durante los años iniciales del desarrollo de esta Tesis, nuestro laboratorio mostró que ratones deficientes en autorreceptores D2 presentan una mayor sensibilidad a la cocaína y un aumento en la motivación por la búsqueda de recompensas alimentarias (Bello *et al.*, 2011). Otro estudio realizado en humanos mostró que individuos sanos con niveles disminuidos de autorreceptores D2 tienden a ser más impulsivos, y liberan más dopamina al recibir anfetamina (Buckholtz *et al.*, 2010). Estos dos trabajos ilustran la importancia funcional de los autorreceptores D2 para modular la actividad de las neuronas dopaminérgicas y evitar el desarrollo de conductas potencialmente impulsivas o compulsivas así como también exponen la necesidad de entender cómo se regula la transcripción de *Drd2* en las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio.

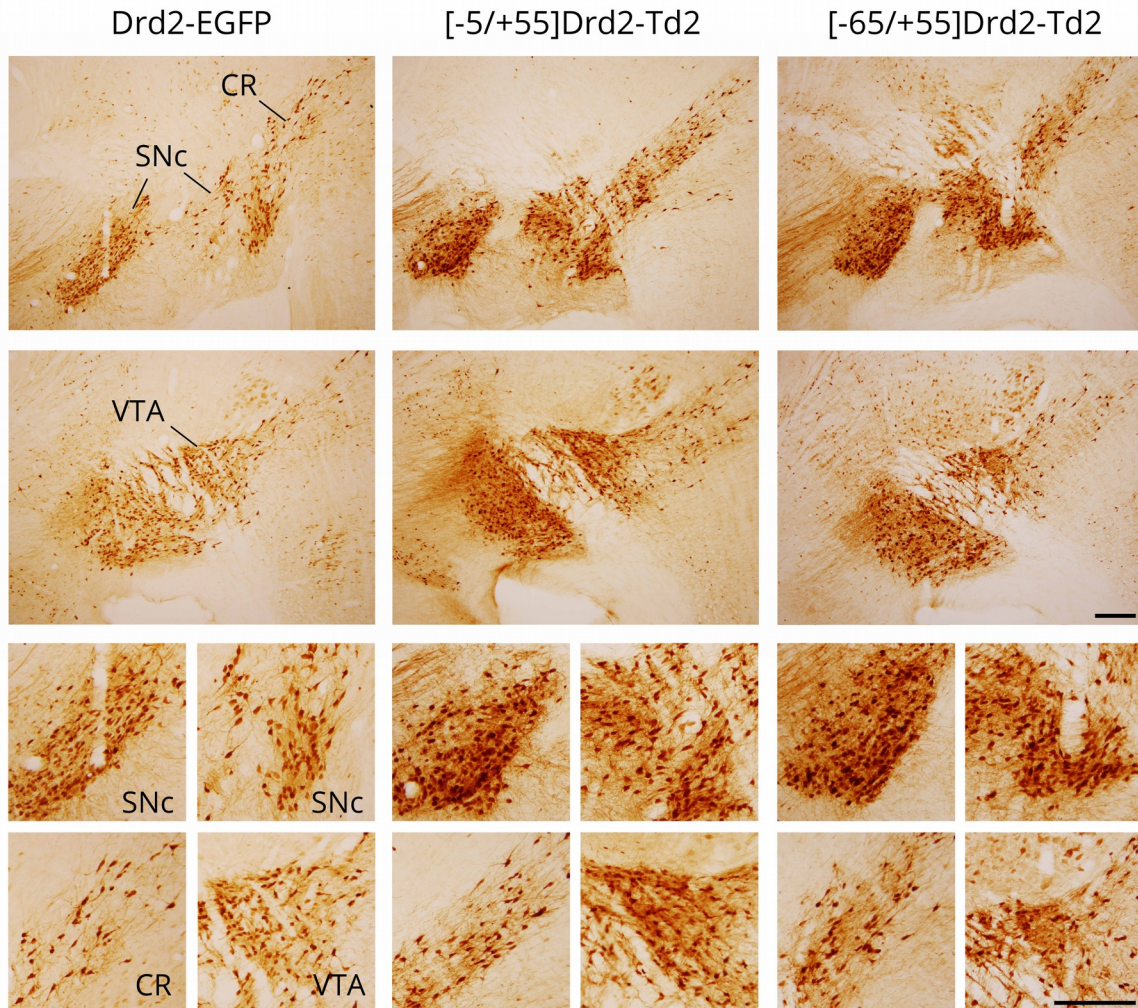


Figura 14. Expresión transgénica producida por los distintos BACs en el cerebro medio. Se muestran cortes sagitales de cerebro comparando la expresión de las proteínas reporteras, reveladas por inmunohistoquímica, producidas por los diferentes BACs. En secciones laterales del cerebro medio se observa la SNc y el campo retrorubral (CR), y en secciones mediales el VTA. Escala 500 μ m.

También observamos expresión producida por los diferentes BACs en el núcleo arcuato del hipotálamo y el núcleo olivar pretectal (OP; Figura 15), donde también se ha descrito la presencia del D2R. El núcleo arcuato se encuentra en la base del hipotálamo y es aquí donde se hallan las neuronas dopaminérgicas que componen el grupo A12. El OP se localiza en el cerebro medio dorsal y es sabido que recibe inervaciones provenientes de la retina (Gamlin, 2006). Tanto [-65/+55]*Drd2*-Td2 como [-65/+55]*Drd2*-Td2 dirigen la expresión de Td2 en células del núcleo arcuato y OP con los mismos patrones observados en ratones *Drd2*-EGFP positivos (Figura 15). La presencia de Td2 resultó similar entre las líneas transgénicas generadas.

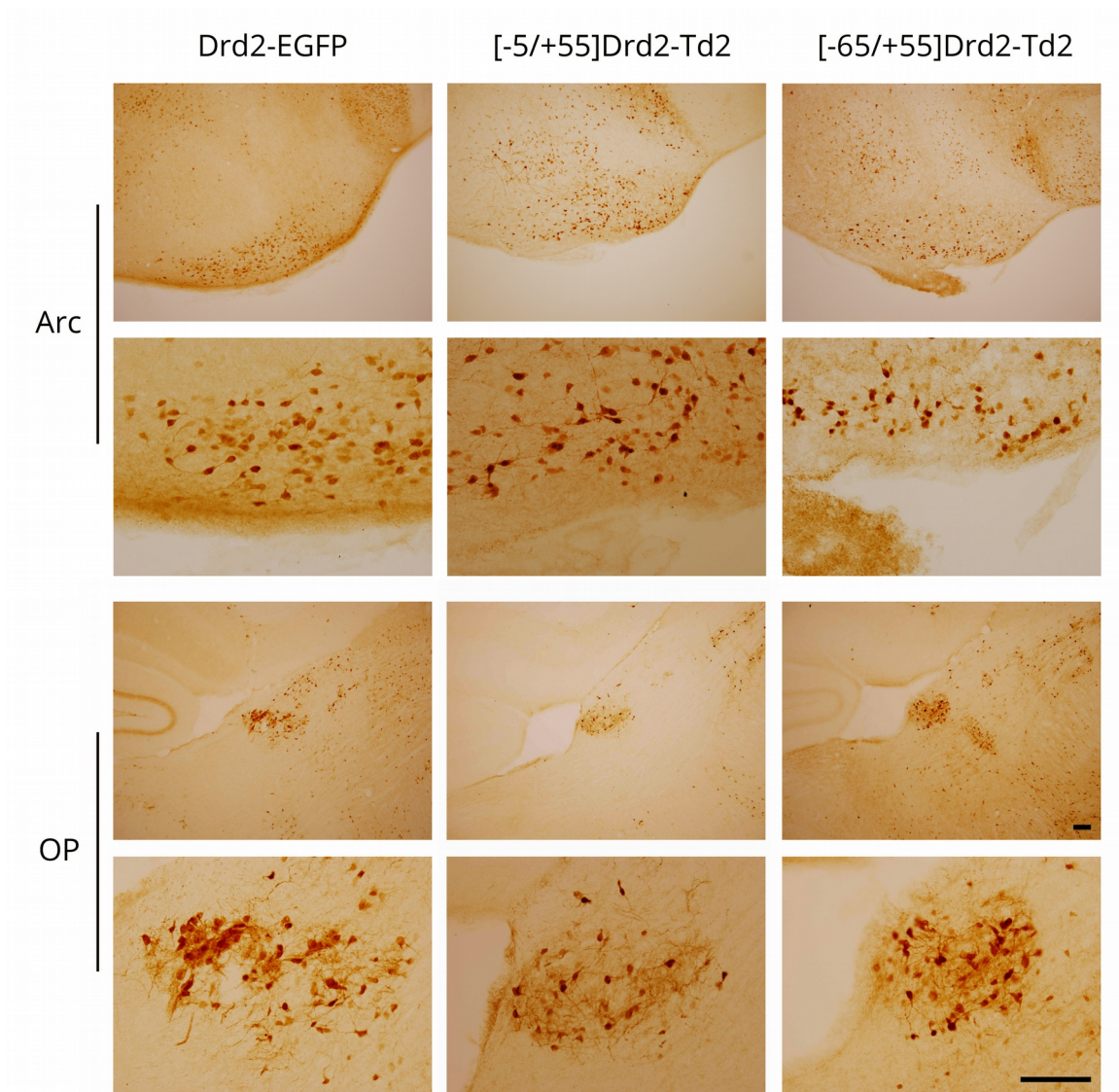


Figura 15. Expresión transgénica producida por los BACs en el núcleo arcuato del hipotálamo y el núcleo olivar pretectal. Se muestran cortes sagitales de cerebro comparando la expresión de las proteínas reporteras producidas por los diferentes BACs en el núcleo arcuato (Arc) y el núcleo olivar pretectal (OP). Escala 100 μ m.

Al examinar regiones telencefálicas mediales de ratones, hallamos que los BACs dirigen la expresión en el *septum* y en la corteza prefrontal medial (mPFC), presentando niveles moderados de las proteínas reporteras. Los dos BACs que utilizamos para generar ratones transgénicos producen patrones reproducibles entre las diferentes líneas que coinciden con los producidos por el BAC *Drd2*-EGFP (Figura 16).

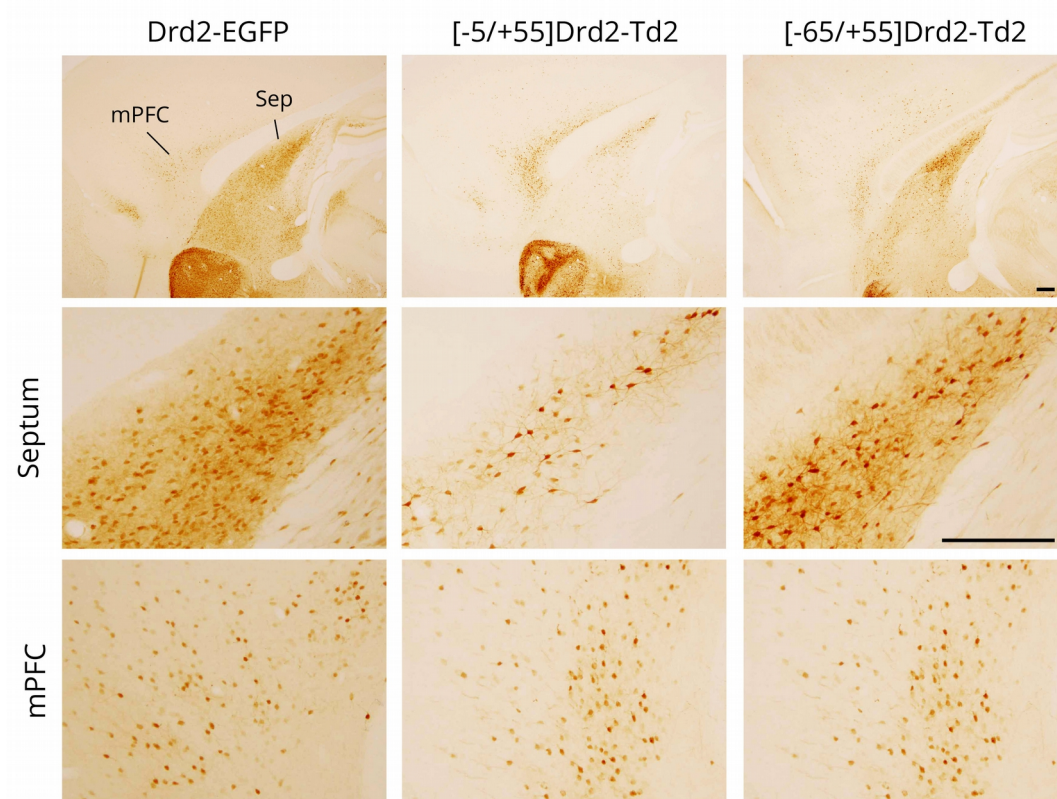


Figura 16. Expresión de EGFP o Td2 producida por los BACs en el septum y la corteza prefrontal medial. Se muestran cortes sagitales de cerebro comparando la expresión de las proteínas reporteras producidas por los diferentes BACs en el septum (Sep) y la mPFC detectadas por inmunohistoquímica. NAc: Núcleo accumbens. Escala 250 μ m.

Al analizar la expresión producida por los BACs en la hipófisis, encontramos que las proteínas reporteras se expresan intensamente en el lóbulo intermedio (Figura 17). En el lóbulo anterior también observamos células dispersas aunque con niveles de expresión relativamente bajos (Figura 17). Las dos líneas [-65/+55]*Drd2*-Td2 expresaron Td2 en el lóbulo anterior y en el intermedio. De las cuatro líneas [-5/+55]*Drd2*-Td2 observamos expresión en el lóbulo anterior de dos líneas y en el lóbulo intermedio de tres.

Los resultados obtenidos mediante el análisis delecional del BAC *Drd2*-EGFP brindan un avance en la comprensión de la regulación transcripcional de *Drd2*, permitiendo focalizar la atención en la región -5/+55, tres veces menor que la del vector inicialmente utilizado (BX37). Cabe destacar que las regiones eliminadas río arriba y río abajo también podrían contener elementos en *cis* que dominen áreas de expresión similares o idénticas a los que se hallan en la región -5/+55. No es inusual que más de un *enhancer* controle la transcripción de un gen en una misma población celular, permitiendo robustecer la expresión del gen (Frankel *et al.*, 2010; Perry *et al.*, 2010; Franchini *et al.*, 2011; Lam *et al.*, 2015).

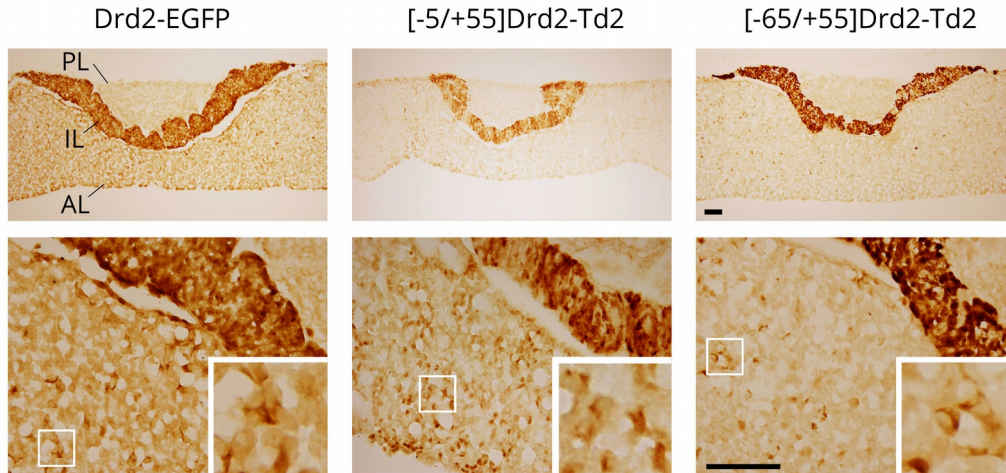


Figura 17. Expresión transgénica producida por los distintos BACs en la hipófisis. Se muestran tinciones inmunohistoquímicas de cortes coronales de hipófisis de ratones transgénicos para los diferentes BACs. La expresión de Td2 en células del lóbulo intermedio (LI) y anterior (LA) es similar a la observada para *Drd2*-EGFP. LP: Lóbulo posterior. Escala 100 μ m.

Esta tecnología sofisticada y precisa de recombinación en BACs, por primera vez usada en el laboratorio del Dr. Rubinstein para construir ratones transgénicos portadores de grandes fragmentos de ADN, ha resultado ser muy valiosa en la primera etapa de este trabajo doctoral permitiendo focalizar los estudios siguientes dentro de regiones mucho más acotadas que las iniciales.

2. Identificación de regiones que dirigen la expresión de *Drd2* en diferentes áreas del cerebro

Considerando que el fragmento -5/+55 probó ser suficiente para dirigir la expresión de la proteína fluorescente Td2 en áreas del cerebro donde normalmente se expresa *Drd2* decidimos profundizar la estrategia de disección transcripcional de *Drd2* acotando las regiones de estudio a aquellas que contienen una mayor densidad de elementos conservados. Dos regiones sobresalen al observar los niveles de conservación, una vecina al TSS y primer exón con una gran densidad de elementos conservados y otra presente en el extremo 3' del primer intrón cercana al exón 2 (Figura 18A). El primer fragmento, de unas 15 kb, se expande 5 kb río arriba y 10 kb río abajo del TSS, y contiene 5 elementos presentes en la Tabla 2 (Figura 18A). Algunas de las secuencias conservadas en mamíferos placentarios detectados por PhastCons también se encuentran conservadas en el marsupial *Monodelphis domestica* (opossum). La selección purificadora en una escala evolutiva más abierta fue ponderada en el análisis porque refuerza la posibilidad de que esa secuencia juegue algún papel regulatorio de relevancia (Figura 18B). La segunda región de interés contiene 4 elementos muy conservados (Tabla 2) y

se expande 7 kb entre las posiciones +43 y +50 respecto del TSS, pero excluye una región muy conservada en la posición +40 (Figura 18A). Todos estos elementos se hallan conservados en mamíferos placentarios y marsupiales. Además, los alineamientos entre 30 vertebrados disponibles en el *Genome Browser* sugieren que los elementos localizados en las posiciones +45 y +46 también tendrían su secuencia ortóloga en vertebrados de otras Clases (Figura 18B).

Para generar transgenes funcionales capaces de transcribir correctamente el gen reportero diseñamos estrategias diferentes para cada fragmento. El estudio del fragmento de 15 kb, -5/+10, que contiene al TSS de *Drd2*, fue ligado a una región mínima del extremo 3' del intrón 1 de *Drd2* seguido por los primeros nucleótidos del exón 2. Esta estrategia genera un mini-intrón 1 de ~10 kb que aseguraría un evento de *splicing* correcto. La secuencia codificante de *Td2* fue insertada justo río arriba del sitio ATG de inicio de la traducción del exón 2 de *Drd2*. Esta construcción fue denominada [-5/+10]*Drd2*-Td2 (Figura 18A).

Para estudiar al fragmento +43/+50 de 7 kb decidimos fusionarlo río arriba del promotor mínimo de la timidina quinasa del virus *Herpes simplex* (TK). Este promotor mínimo, extensamente utilizado en la literatura y en nuestro laboratorio, es incapaz de promover por sí solo la transcripción de genes reporteros en cerebro e hipófisis de ratones transgénicos (de Souza et al., 2005). Dado que los niveles de expresión transgénica son mayores cuando los genes contienen intrones factibles de ser procesados por la maquinaria de *splicing* (Choi et al., 1991; Furger et al., 2002; Nott et al., 2004; Wiegand et al., 2003), utilizamos en esta construcción un fragmento de 3,3 kb conteniendo al intrón 1 de *Pomc* flanqueado por unos pocos nucleótidos del primer y segundo exón del mismo gen. Así, el transgén está formado por el fragmento +43/+50 de *Drd2* seguido del promotor de TK, el intrón 1 de *Pomc* flanqueado por secuencias exónicas y el gen reportero *Tdimer2* ([+43/+50]*Drd2*-Td2; Figura 18A).

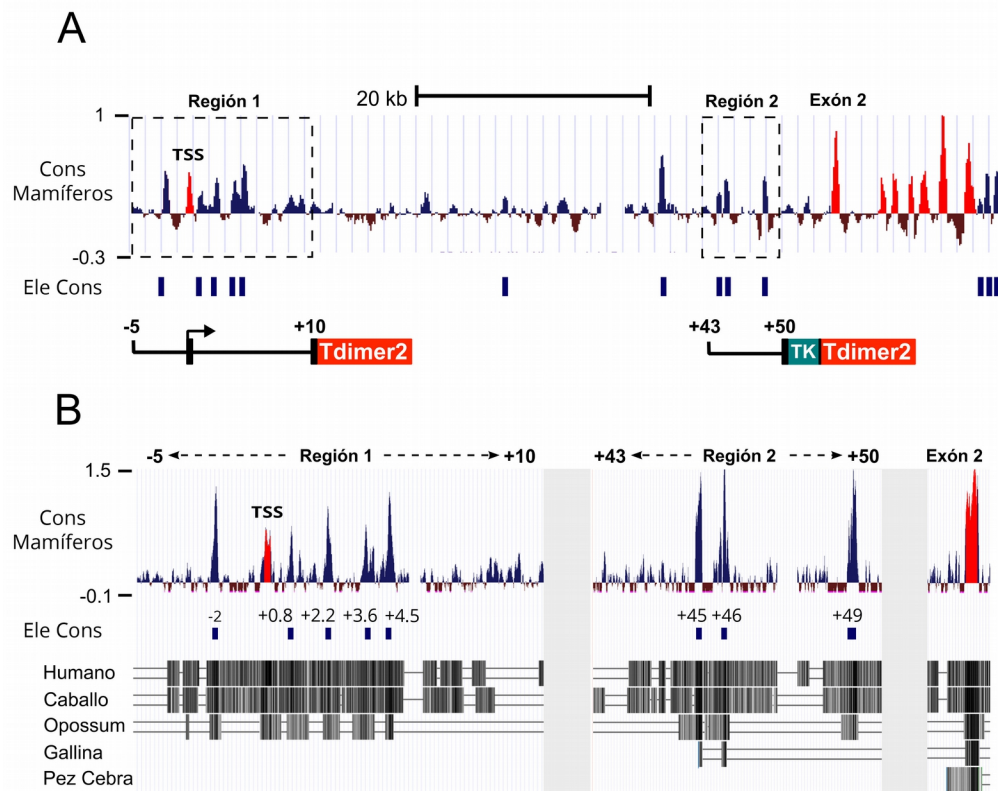


Figura 18. Elementos conservados en la unidad transcripcional de *Drd2* incluidos en los transgenes [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2. A. La unidad transcripcional de *Drd2* -5/+55 contiene una gran cantidad de los elementos conservados listados en la Tabla 2 (Ele Cons). Las regiones 1 (-5/+10) y 2 (+43/+50) indicadas fueron utilizadas para generar los transgenes. La conservación entre mamíferos medida por PhyloP muestra un panorama de la región (Cons Mamíferos), donde también se puede observar la conservación del TSS y los exones de *Drd2*. **B.** La región 1 utilizada para la construcción [-5/+10]*Drd2*-Td2 contiene 5 elementos conservados listados previamente ubicados en las posiciones -2, +0.8, +2.2, +3.6 y +4.5 respecto del TSS y los alineamientos múltiples entre 30 vertebrados indican que también están conservados en marsupiales (*Opossum*). La región 2 utilizada para la construcción [+43/+50]*Drd2*-Td2 tiene 3 de estos elementos (+45, +46 y +49), la presencia de secuencias alineadas con el ADN de gallina sugiere un nivel de conservación funcional entre distintas clases de vertebrados.

Para analizar los perfiles de expresión de los transgenes [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2 en cerebro e hipófisis, generamos 3 líneas de ratones transgénicos con la primera construcción y 2 con la segunda. El transgén con el promotor proximal de *Drd2* produjo patrones de expresión consistentes entre las diferentes líneas de ratones mostrando altos niveles de Td2 en el *septum* y la corteza cerebral, y bajos niveles en el cerebro medio (Figura 19; Figura suplementaria 3). En cambio, los ratones transgénicos para [+43/+50]*Drd2*-Td2 presentaron altos niveles de expresión tanto en neuronas del estriado dorsal y ventral como en áreas dopaminérgicas del cerebro medio (Figura 19; Figura suplementaria 3).

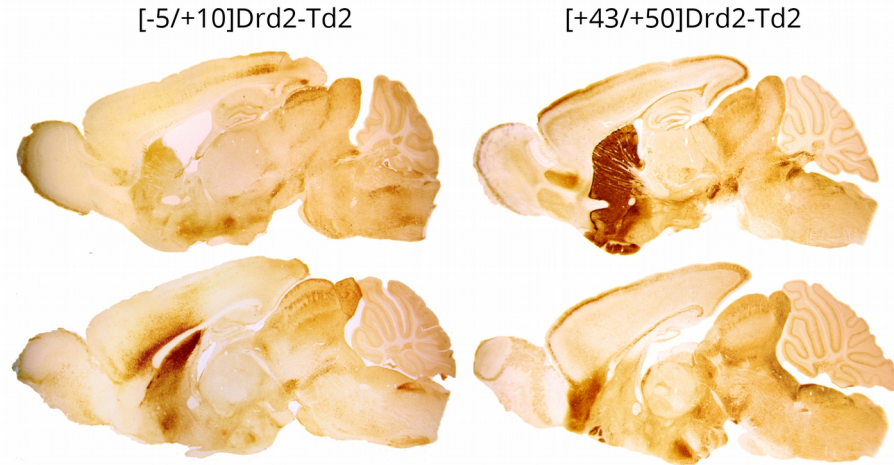


Figura 19. Los transgenes [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2 producen patrones de expresión diferentes. En cortes sagitales laterales se puede observar que el área estriatal se encuentra dominada por la región genómica +43/+50 (Arriba). En cambio en cortes mediales se observa que es la región genómica -5/+10 la que domina otra área cerebral, el *septum* (Abajo)

2.1. Expresión de Td2 en el cuerpo estriado

El cuerpo estriado es la región del cerebro con mayor cantidad de neuronas que expresan *Drd2* y, como comentamos en la Introducción, los D2Rs están distribuidos tanto en somas de neuronas GABAérgicas estriadopálidas de la vía extrapiramidal indirecta como en interneuronas magnocelulares colinérgicas y también en terminales de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales donde cumplen funciones de autorreceptor. En la Figura 20 se observa la expresión de la proteína reportera Td2 producida por el transgén [+43/+50]*Drd2*-Td2 distribuida homogéneamente tanto en el estriado dorsal como en el ventral siendo particularmente intensa en los cuerpos celulares, mientras que en ratones [-5/+10]*Drd2*-Td2 sólo se observan algunas células aisladas expresando Td2 en esta área. Ninguna de las 3 líneas generadas con el transgén [-5/+10]*Drd2*-Td2, que incluye el promotor proximal de *Drd2*, logró reproducir el patrón característico de expresión del D2R en el estriado (Figura suplementaria 3). Sin embargo, como mostraremos más adelante, estas neuronas aisladas podrían formar parte de una subpoblación de interneuronas colinérgicas que expresan *Drd2* en el cuerpo estriado. Las dos líneas de ratones transgénicos [+43/+50]*Drd2*-Td2 mostraron niveles de expresión de Td2 en el cuerpo estriado con similar intensidad y con una densidad y distribución similar a la de las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta (Figura suplementaria 3) que habíamos observado en los BACs mostrados anteriormente (Figura 13).

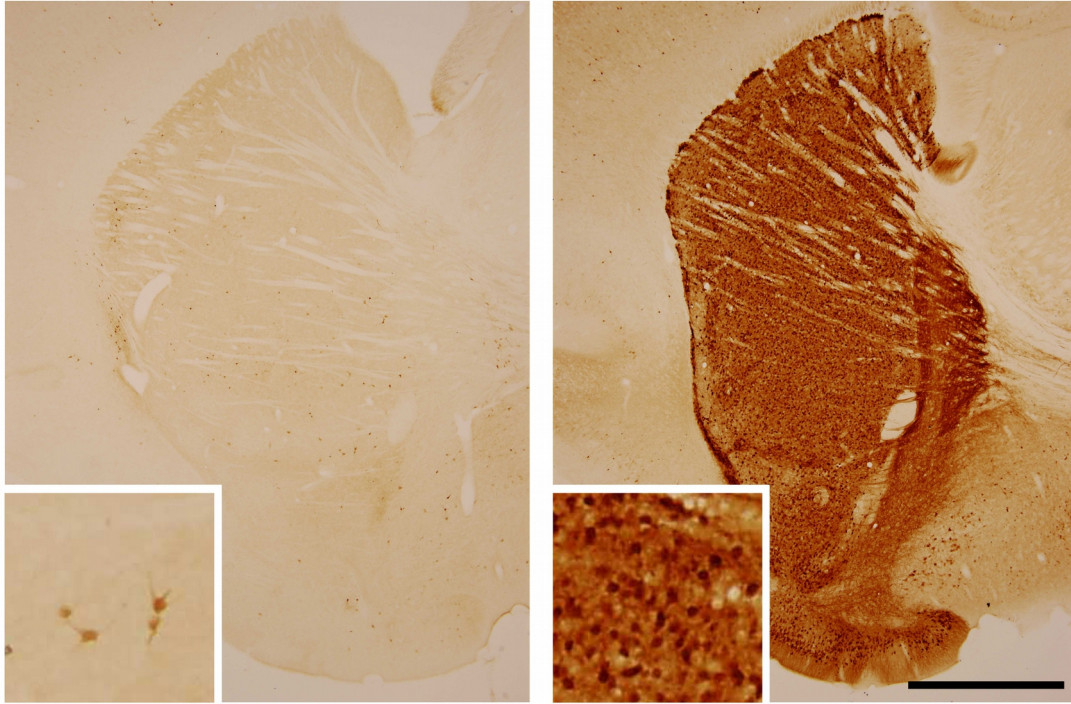


Figura 20. Expresión estriatal de los transgenes [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2. Se muestran cortes de cerebros sagitales inmunomarcados contra Td2. Mientras que [-5/+10]*Drd2*-Td2 es capaz de dirigir la expresión de Td2 en neuronas estriatales aisladas (izquierda), el transgén [+43/+50]*Drd2*-Td2 produce una expresión homogénea en esta área del cerebro (derecha). Escala 1 mm.

El promotor de *Drd2* ha sido extensamente estudiado en la búsqueda de vías de señalización (Takeuchi *et al.*, 2002) y de factores de transcripción implicados en la expresión del gen (Hwang *et al.*, 2001; Samad *et al.*, 1997; Seo *et al.*, 2012; Valdenaire *et al.*, 1994). Estos trabajos, realizados mayormente en transfecciones transientes de neuronas en cultivo, sugieren que la región promotora proximal tendría un rol fundamental en la regulación de *Drd2* y proponen su participación en la expresión estriatal. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral cuestionan la importancia de la región promotora en la expresión estriatal de *Drd2* dado que los ratones transgénicos constituyen un sistema de expresión mucho más fidedigno que los cultivos celulares. Nuestros resultados muestran que la región promotora de *Drd2* presente en el transgén [-5/+10]*Drd2*-Td2 no es suficiente para dirigir la expresión en neuronas GABAérgicas del estriado, mientras que la región +43/+50 sí posee la capacidad de dirigir la expresión de Td2 tanto a neuronas del estriado dorsal como ventral con un patrón de distribución típico de neuronas GABAérgicas estriatales (Figura 20). Estos resultados, obtenidos con un promotor heterólogo y en ausencia del promotor proximal de *Drd2*, sugieren que la región +43/+50 cumple un papel fundamental en la regulación transcripcional de *Drd2* en el estriado.

2.2. Expresión de Td2 en el cerebro medio

En la Figura 21 se comparan cortes sagitales inmunomarcados contra Td2 en el cerebro medio de líneas generadas con los transgenes [-5/+10]*Drd2*-Td2 (Figura 21 A-D) y [+43/+50]*Drd2*-Td2 (Figura 21 E-H). Las tres líneas de ratones generadas con el transgén [-5/+10]*Drd2*-Td2 mostraron bajos niveles de expresión en la SNc, el VTA y el área retrorubral, en donde se hallan las neuronas dopaminérgicas. Por otro lado, los ratones transgénicos para [+43/+50]*Drd2*-Td2 mostraron niveles de expresión moderados en dichas áreas (Figura suplementaria 3). Dado que ambos transgenes tienen diferentes promotores e intrones y que la técnica de transgénesis por microinyección pronuclear de cigotos murinos prevé la existencia de efectos posicionales no podemos realizar comparaciones cuantitativas. De todas maneras, dado que ambos transgenes son capaces de dirigir la expresión de Td2 en neuronas en áreas dopaminérgicas del cerebro medio y del área retrorubral, es posible que elementos presentes en ambas regiones actúen concertadamente para expresar *Drd2* en estas áreas.

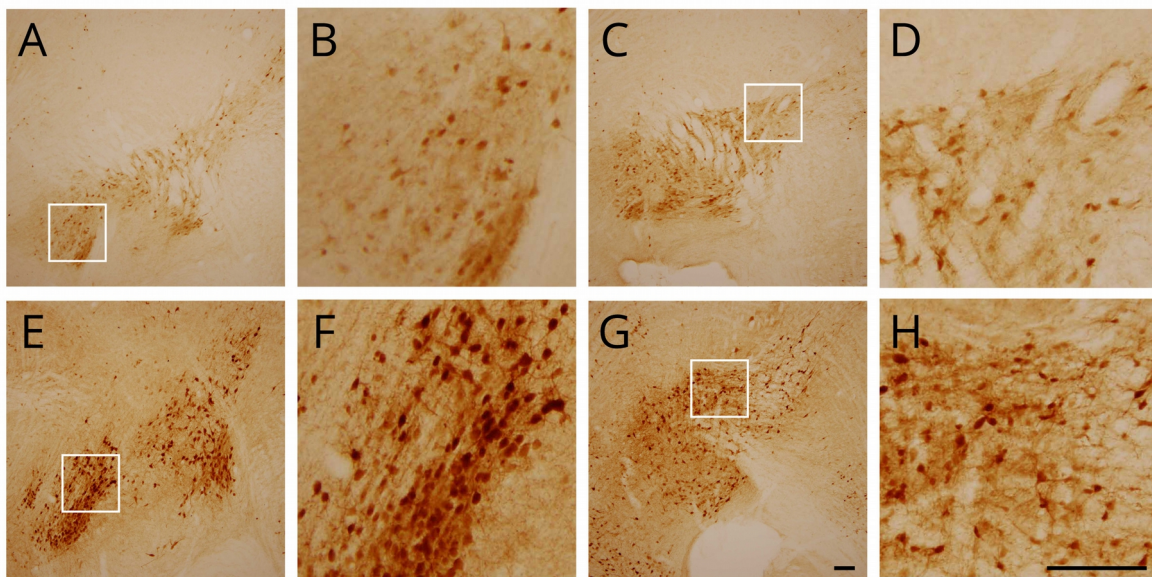


Figura 21. Expresión de Td2 producida por los transgenes [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2 en el cerebro medio. La expresión observada ratones por el [-5/+10]*Drd2*-Td2 (A-D) en el cerebro medio es similar pero de menor intensidad que la observada ratones [+43/+50]*Drd2*-Td2 (E-H). En A y E se puede observar la marca de Td2 en la SNc y en el campo retrorubral, B y F corresponden a la ampliación en la SNc. C y G región del VTA, D y H ampliaciones del VTA. Imágenes de cortes sagitales. Escala 250 μm.

2.3. Expresión de Td2 en el *septum* y la corteza prefrontal medial

El *septum* y la corteza prefrontal medial (mPFC) componen otras áreas de expresión de *Drd2* en las que encontramos expresiones diferenciales de Td2 para ambos transgenes, y con resultados consistentes para cada transgén entre las diferentes líneas. En la Figura 22 se muestran cortes sagitales inmunomarcados que incluyen al *septum* y corteza prefrontal, en donde se pueden observar que el transgén [-5/+10]*Drd2*-Td2 dirige la expresión del reportero en dichas zonas con fuerte intensidad (Figura 22 A-C). La expresión en la corteza corresponde principalmente a la región de la mPFC que incluye la corteza dorsal peduncular, infralímbica, prelímbica, y cingulada. La inmunotinción contra Td2 revela la presencia de cuerpos celulares tanto en la mPFC como en el *septum* (Figura 22 B y C, respectivamente). Contrariamente, ratones transgénicos [+43/50]*Drd2*-Td2 no mostraron expresión auténtica en estas áreas (Figura 22 D-F). Si bien una de las dos líneas [+43/50]*Drd2*-Td2 presentó una elevada expresión ectópica en la corteza cerebral, la expresión producida por [-5/+10]*Drd2*-Td2 en el *septum* y el mPFC es consistente e intensa en las 3 líneas (Figura suplementaria 3).

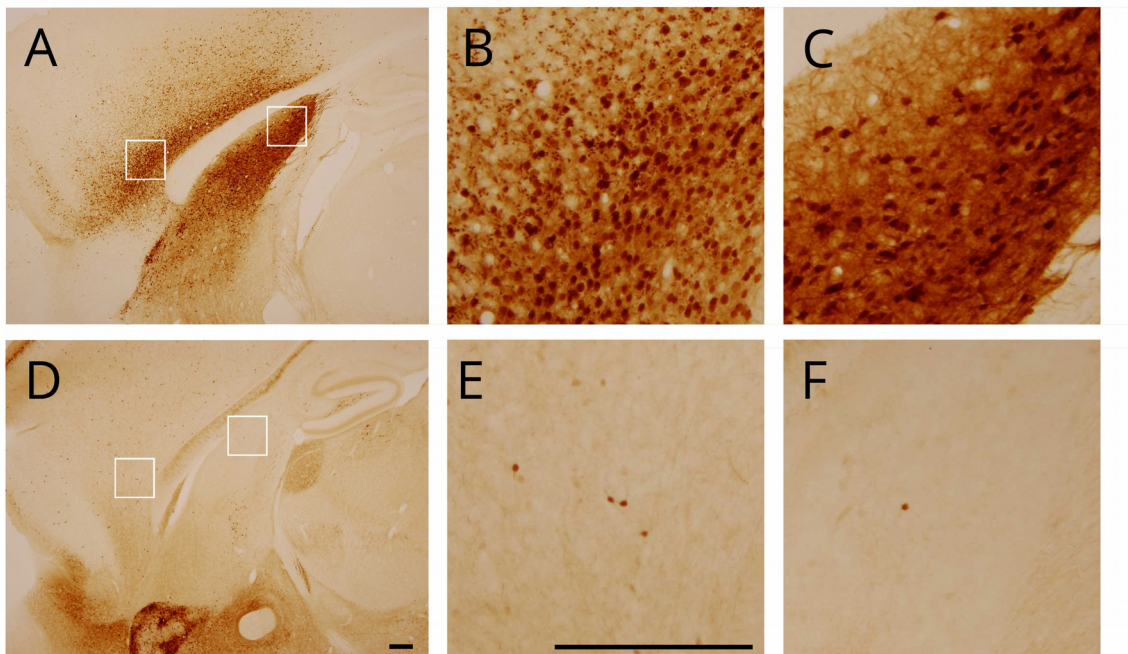


Figura 22. Expresión de Td2 en la mPFC y el *septum* de ratones transgénicos [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2. En cortes sagitales inmunomarcados contra Td2 se muestran ratones [-5/+10]*Drd2*-Td2 positivos (A-C) expresando Td2 intensamente en la mPFC (B) y el *septum* (C). En cambio, el transgén [+43/+50]*Drd2*-Td2 no dirige la expresión en estas áreas (E y F, respectivamente). Escala 250 μ m.

Si bien no está claro cuál es el papel de los D2Rs en las neuronas septales, esta estructura ha sido vinculada con conductas adictivas y con síntomas que se producen en adictos durante la abstinencia (Renard *et al.*, 2014; Sotomayor-Zárate *et al.*, 2010, 2013). En un estudio novedoso se trazó un circuito que se origina en el hipocampo y llega hasta en el VTA usando como estructura de relevo al *septum* (Luo *et al.*, 2011). De este trabajo surge la hipótesis de que el *septum* sería una estructura clave para unir los conceptos de lugar y recompensa a nivel neurofisiológico. Tampoco el rol del D2R en la corteza cerebral ha sido del todo esclarecido. Aunque existen hipótesis que vinculan la transmisión dopaminérgica mesocortical excesiva con la fisiopatología de la esquizofrenia se cree que normalmente está implicada en la organización espacio-temporal de las acciones motoras y su relación con información emocional y cognitiva. La hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia se basa en que antagonistas que bloquean D2R tienen probados efectos antipsicóticos en relación directa con su afinidad (Richtand *et al.*, 2007; Seeman *et al.*, 1976). Además, se observó que pacientes con esquizofrenia presentan un volumen disminuido y un metabolismo alterado de la corteza cingulada (Haznedar *et al.*, 2004).

2.4. Expresión de Td2 en el núcleo arcuato del hipotálamo y la hipófisis

Al analizar la expresión producida por los transgenes en el núcleo arcuato hipotalámico encontramos nuevamente que [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2 tienen actividades diferentes. En las tinciones inmunohistoquímicas realizadas sobre cortes sagitales se puede observar que los ratones transgénicos [-5/+10]*Drd2*-Td2 no expresan Td2 en el núcleo arcuato del hipotálamo (Figura 23 A y B), en ninguna de las tres líneas generadas (Figura suplementaria 3). Por el contrario en las dos líneas generadas con [+43/+50]*Drd2*-Td2 se pueden observar un elevado número de neuronas marcadas en esta área (Figura 23 A y B; Figura suplementaria 3). Si bien la función del receptor en estas neuronas no ha sido extensamente estudiada, trabajos realizados sobre el D2R en este grupo neuronal sugieren que el receptor podría cumplir diversas funciones afectando la vía de señalización de la leptina, las conductas relacionadas con el abuso de drogas, y la regulación de la liberación de prolactina en hembras (Doron *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010a; Liang *et al.*, 2014). También es interesante recordar que en el núcleo arcuato se localiza el grupo de neuronas dopaminérgicas conocido como A12, por lo que es posible que el receptor D2 en esta área cumpla en parte el rol de autorreceptor.

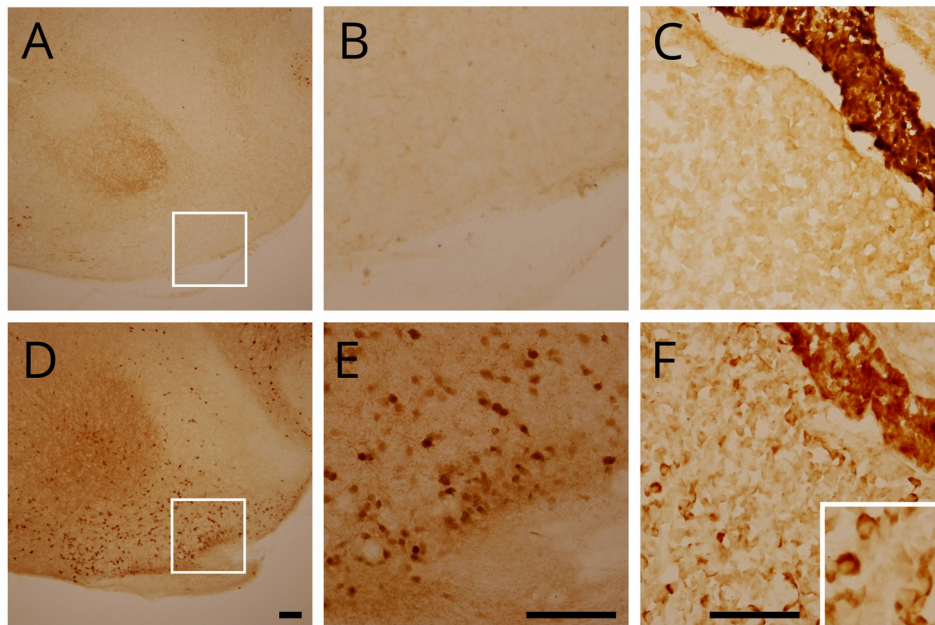


Figura 23. Expresión de Td2 en ratones transgénicos [-5/+10]Drd2-Td2 y [+43/+50]Drd2-Td2 en el núcleo arcuato y la hipófisis. Los ratones [-5/+10]Drd2-Td2 (A-C) no mostraron expresión en el núcleo arcuato (A y su ampliación B) pero sí en la hipófisis medial (C). En cambio ratones transgénicos [+43/+50]Drd2-Td2 (D-F) mostraron expresión en células del núcleo arcuato (D y su ampliación E), en el lóbulo intermedio de la hipófisis y en células de la hipófisis anterior (F). Escala 100 μ m.

Es interesante destacar que ambos transgenes dirigen la expresión en el lóbulo intermedio de la hipófisis donde el D2R controla la síntesis y liberación de péptidos de *Pomc* (Figura 23 C y F). En el lóbulo anterior hipofisario, donde *Drd2* se expresa en la población de lactotropos, sólo se observan células Td2 positivas en los ratones transgénicos [+43/+50]Drd2-Td2 (Figura 23F). La hipófisis se encuentra íntimamente ligada al núcleo arcuato por medio de la vía tuberoinfundibular. Las neuronas del grupo A12 en dicho núcleo liberan dopamina hacia los espacios perivasculares en la zona externa de la eminencia media y, de esta manera, el neurotransmisor es transportado por los vasos portales hacia la hipófisis anterior. Es allí donde la dopamina controla la síntesis y liberación de prolactina a través de la estimulación de D2R en lactotropos. En las secciones siguientes analizaremos mediante estudios de colocalización con marcadores celulares si estas células Td2 positivas en el lóbulo anterior son lactotropos.

3. Análisis de la expresión de Td2 en neuronas que expresan *Drd2*

Para determinar cuáles dominios de expresión inducidos por las regiones -5/+10 y +43/+50 coinciden con los de *Drd2* y analizar el grado de coexpresión entre el gen reportero Td2 y *Drd2*, cruzamos ratones transgénicos [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2 con ratones *Drd2*-EGFP del proyecto GENSAT. Los ratones dobles transgénicos obtenidos nos permiten visualizar simultáneamente la expresión de Td2 y EGFP en los mismos cortes histológicos mediante microscopía de fluorescencia. Ante la ausencia de anticuerpos anti-D2R confiables recurrimos a esta alternativa experimental dado que además la fidelidad de la expresión de EGFP en ratones *Drd2*-EGFP se encuentra validada, aunque principalmente en el estriado (Lobo *et al.*, 2006; Matamales *et al.*, 2009; Shuen *et al.*, 2008; Thibault *et al.*, 2013)

La Figura 24 resume en parte los resultados de esta sección, permitiendo hacer un análisis general de las regiones regulatorias de la expresión de *Drd2*. Se muestran imágenes a bajo poder óptico de secciones coronales fluorescentes de cerebro, a nivel del estriado y del cerebro medio. Para aumentar la señal de las proteínas reporteras las imágenes fluorescentes que se muestran están tomadas sobre tejido sometido a técnicas de inmunofluorescencia. Los transgenes [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2 muestran patrones de expresión complementarios al comparar los territorios de coexpresión con *Drd2*-EGFP en el cuerpo estriado y el *septum*. Mientras que los ratones transgénicos [-5/+10]*Drd2*-Td2 expresan Td2 fuertemente en el *septum*, los ratones [+43/+50]*Drd2*-Td2 lo hacen en el estriado (Figura 24A). A nivel del cerebro medio, los ratones transgénicos [+43/+50]*Drd2*-Td2 muestran una amplitud territorial más plena y señal más intensa tanto en la SNc como en el VTA (Figura 24B), coincidiendo con el patrón de expresión observado en ratones *Drd2*-EGFP. En las secciones siguientes detallaremos los análisis de coexpresión para cada transgén.

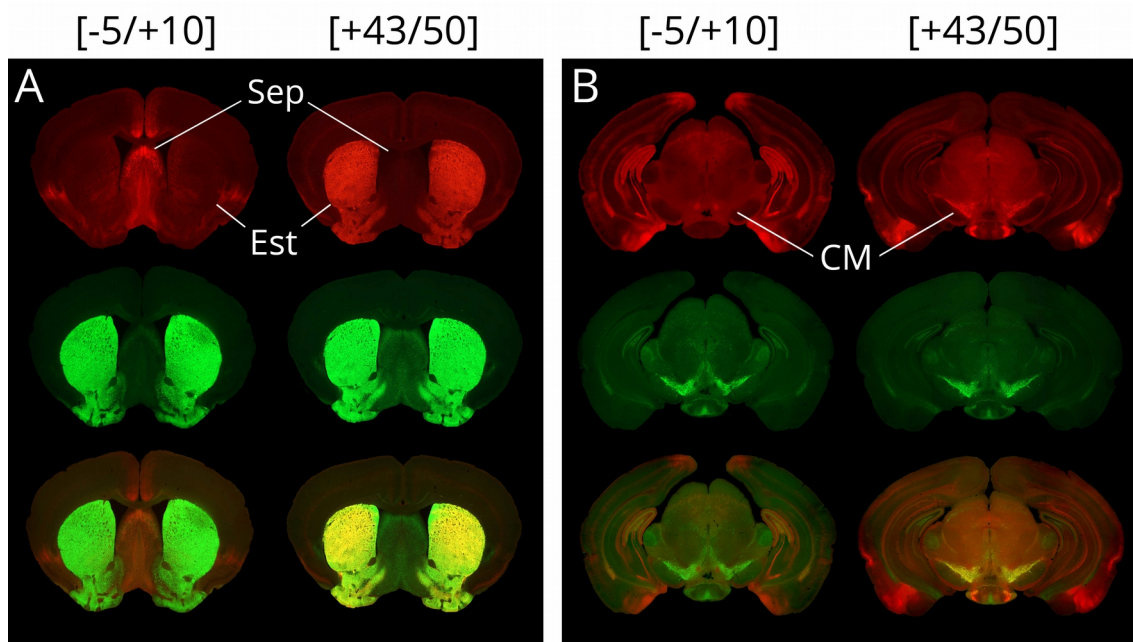


Figura 24. Coexpresión en ratones dobles transgénicos [-5/+10]*Drd2*-Td2/*Drd2*-EGFP y [+43/+50]*Drd2*-Td2/*Drd2*-EGFP. Inmunofluorescencias dobles contra Td2 y EGFP; en rojo Td2, en verde EGFP, y amarillo la superposición (Abajo). **A.** En cortes coronales se observa que el transgén [-5/+10]*Drd2*-Td2 domina la región septal (Sep), también evidente en *Drd2*-EGFP. En cambio, [+43/+50]*Drd2*-Td2 domina la región estriatal (Est) de manera similar a *Drd2*-EGFP. **B.** En cortes coronales a la altura del cerebro medio se observa que ratones transgénicos [+43/+50]*Drd2*-Td2 expresan Td2 en la SNc y VTA, al igual que *Drd2*-EGFP. Los ratones transgénicos [-5/+10]*Drd2*-Td2 en cambio, muestran señal positiva en estas áreas.

3.1. Coexpresión en ratones transgénicos [-5/+10]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP

Los transgenes [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2 dirigen la expresión de Td2 en el cerebro y en la hipófisis produciendo patrones muy diferentes entre sí. Sin embargo, ambos perfiles se encuentran presentes en ratones *Drd2*-EGFP. La región -5/+10 parece tener una mayor dominancia en la mPFC y el *septum*, para evaluar la hipótesis de que [-5/+10]*Drd2*-Td2 contiene elementos que regulan la transcripción del *Drd2* en éstas subpoblaciones neuronales cruzamos ratones [-5/+10]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP positivos.

En la mPFC el transgén [-5/+10]*Drd2*-Td2 se expresa en un número de neuronas aparentemente mayor al observado para *Drd2*-EGFP en la regiones mediales de las cortezas prelímbica, infralímbica y cingulada (Figura 25). Al superponer las imágenes fluorescentes verde y roja se observa que la densidad de células marcadas con EGFP presenta, en efecto, una menor distribución a lo largo del mPFC en comparación con las neuronas marcadas con Td2 y que muy pocas neuronas coexpresan ambos reporteros (Figura 25).

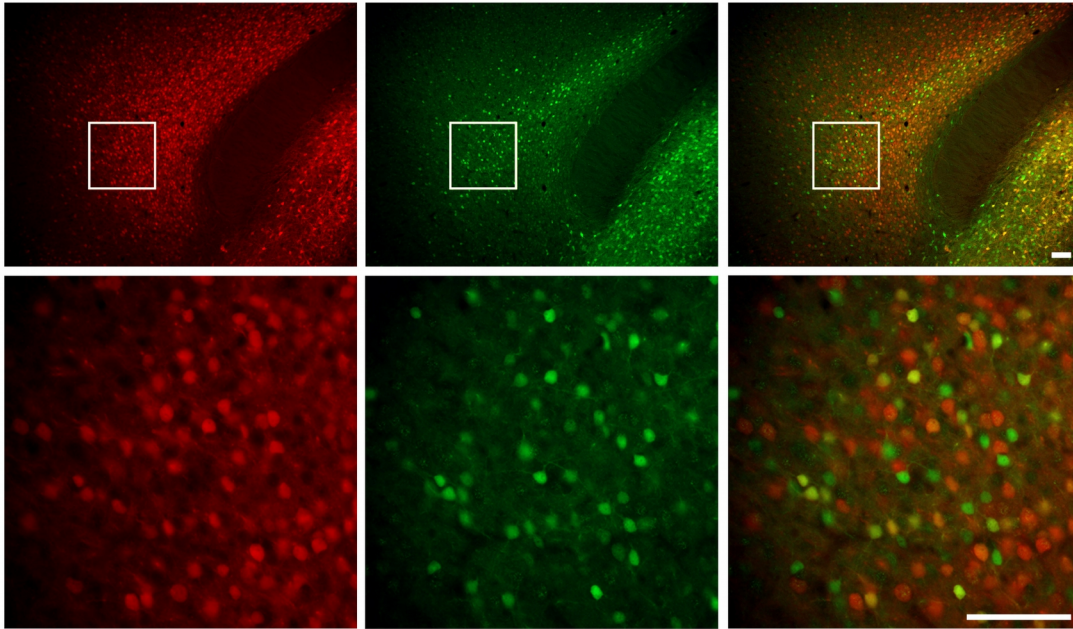


Figura 25. Coexpresión de Td2 y EGFP en la mPFC de ratones [-5/+10]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP. El transgén [-5/+10]*Drd2*-Td2 produce expresión de Td2 en células que se distribuyen con alta densidad en la mPFC (Rojo-Izquierda), *Drd2*-EGFP posee un dominio similar pero con una distribución de menor densidad (Verde-Centro), al superponer ambos canales se observa un bajo número de células que expresan ambos reporteros (Amarillo-Derecha). Escala 100 μ m.

La extensión de la expresión en la mPFC producida por [-5/+10]*Drd2*-Td2 parece ser mayor si la comparamos también con lo observado en los ratones transgénicos generados con los BACs descritos más arriba. Esta diferencia fue observada en todas las líneas generadas con este transgén (Figura suplementaria 3). Por otro lado, la expresión diferencial a nivel celular producida por los transgenes [-5/+10]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP parece indicar que dominan diferentes poblaciones neuronales. Estos fenómenos pueden ser consecuencia de la combinación de varios factores. La eliminación de las regiones flanqueantes al fragmento -5/+10 podría explicar la ampliación del dominio de expresión al perderse posibles elementos silenciadores y/o aisladores. Otra posible causa de estas diferencias estaría relacionada con que ambos eventos de transgénesis resultan de inserciones independientes generando entornos cromatínicos e influencias vecinas distintas que afectan los niveles de expresión de los reporteros en las neuronas del mPFC.

Otro dominio de expresión de [-5/+10]*Drd2*-Td2 es el *septum*. En la Figura 26 se observa una inmunofluorescencia doble de un corte coronal de cerebro, ampliada en la región septal. Las neuronas que expresan los reporteros se hallan densamente distribuidas en el *septum* dorsolateral y el núcleo septohipocampal, disminuyendo su densidad en la región medioventral. La coexpresión de Td2 y EGFP en estas regiones es elevada, pero también pueden observarse

células expresando un único gen reportero. Como comentamos anteriormente este tipo de fenómenos puede deberse a efectos posicionales de los transgenes, a diferencias en el repertorio de elementos regulatorios o a la existencia de niveles subumbrales de expresión en algunas neuronas.

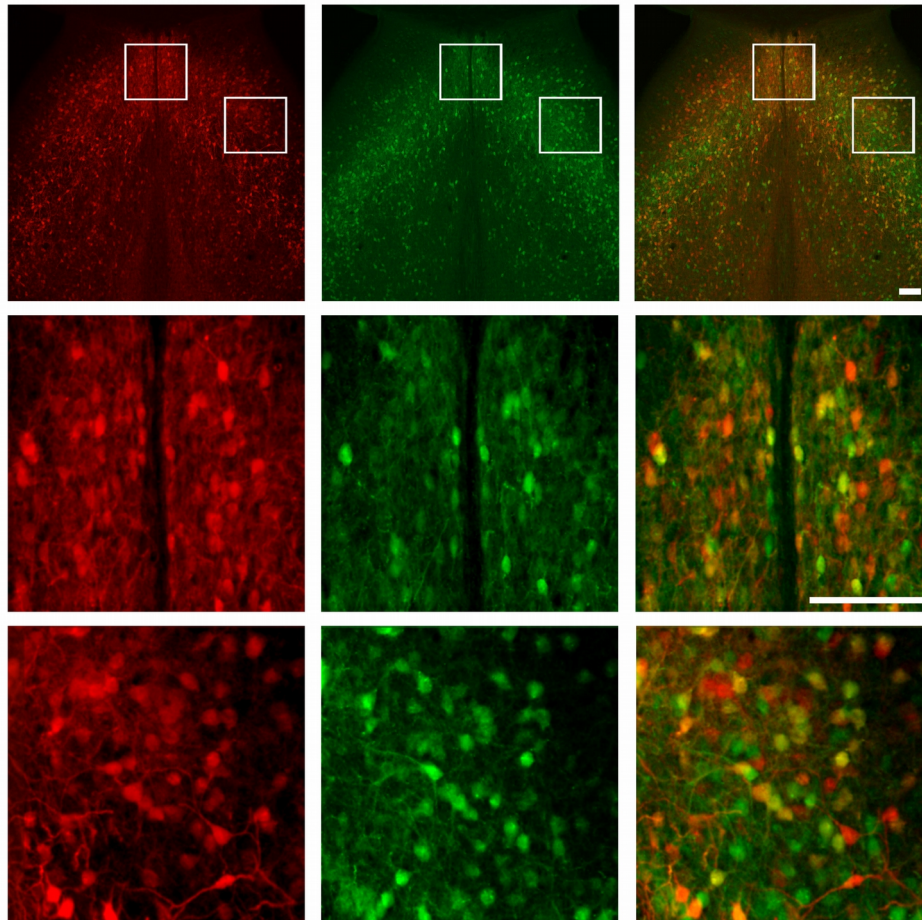


Figura 26. Coexpresión de Td2 y EGFP en el septum de ratones [-5/+10]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP positivos. El transgén [-5/+10]*Drd2*-Td2 produce expresión de Td2 en las regiones del septum dorsolateral y el núcleo septohipocampal (Rojo; izquierda), y EGFP dirigido por el BAC posee un dominio similar (Verde; centro), al superponer ambas imágenes se observan las células expresan ambos reporteros (Amarillo-Derecha). Ampliación superior: núcleo septohipocampal; Ampliación Inferior: Septum dorsolateral. Escala 100 μ m.

Otra región en la que también se puede observar ARNm de *Drd2* es en el núcleo endopiriforme (NE; <http://www.brain-map.org/>). Este núcleo cortical se localiza lateralmente en las capas más profundas debajo de la corteza piriforme y puede ser observado mejor en cortes coronales. Tanto *Drd2*-EGFP como [-5/+10]*Drd2*-Td2 son capaces de dirigir la expresión de sus reporteros en el NE (Figura 27), resultado que observamos en las diferentes líneas. La coexpresión de los reporteros es elevada, casi la totalidad de las neuronas Td2 positivas del núcleo también

expresan EGFP. Sin embargo, observamos un mayor número de neuronas marcadas por *Drd2*-EGFP indicando que el BAC posee un dominio más extenso del NE.

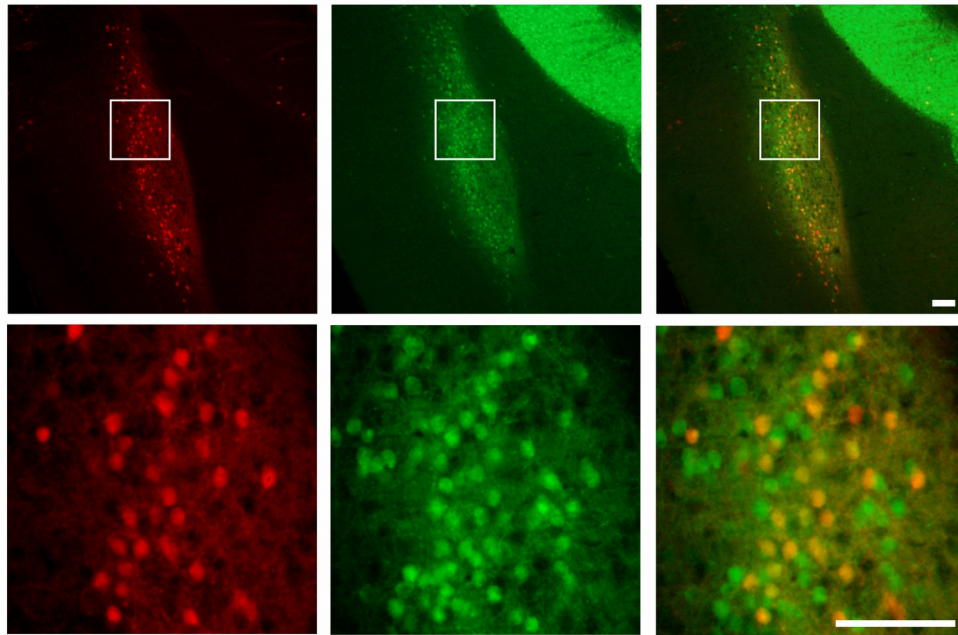


Figura 27. Coexpresión de Td2 y EGFP en el NE de ratones transgénicos para [-5/+10]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP. Td2 producido por [-5/+10]*Drd2*-Td2 (Rojo) colocaliza con EGFP en la mayoría de las células de halladas en el NE (Amarillo; derecha). EGFP producido por *Drd2*-EGFP (Verde) posee una mayor distribución en el núcleo. Escala 100 μ m.

Muy poco se conoce acerca del rol que cumpliría el NE en la fisiología del cerebro. Trabajos pioneros describieron que las neuronas del NE proyectan a lo largo del cerebro abarcando áreas extensas, principalmente compuestas por la corteza piriforme, entorrinal, insular, y la amígdala (Behan y Haberly, 1999; Haberly y Price, 1978; Luskin y Price, 1983). Además, se sugirió que este núcleo tiene un rol clave en la generación de ondas epilépticas (Hoffman y Haberly, 1996; Piredda y Gale, 1985; Stevens *et al.*, 1988). Un estudio electrofisiológico más reciente, realizado en ratas, sugiere que el NE integra y procesa la información olfatoria y gustativa producida en la corteza piriforme y la corteza gustativa (Sugai *et al.*, 2012).

El transgén [-5/+10]*Drd2*-Td2 también dirige la expresión de Td2 en el cerebro medio. Sin embargo, la expresión en esta región se caracteriza por una baja señal en células y alta señal en fibras nerviosas por lo que tuvimos que recurrir al uso de microscopía de fluorescencia confocal para identificar correctamente la señal celular. En la Figura 28 se puede observar una imagen de un corte coronal centrado en la SNc y el VTA, correspondiente a un animal doble transgénico para [-5/+10]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP, en donde la marca de Td2 parece ser principalmente de fibras neuronales, pero también observamos marca en algunos cuerpos

celulares donde colocaliza con EGFP. Es posible que la marca de fibras neuronales provenga de otra región cerebral que inerva la región dopaminérgica del cerebro medio, una de las regiones posibles es el *septum* que ya se ha demostrado que inerva interneuronas GABAérgicas en el cerebro medio (Luo *et al.*, 2011).

Por otro lado, la expresión de Td2 comandada por la región -5/+10 en la hipófisis solo comprende al lóbulo intermedio que contiene casi en su totalidad un único tipo celular: los melanotropos. Existen estudios reportando la expresión de D2R en estos tipos celulares y la participación de la dopamina en la liberación de melanocortina (González de Aguilar *et al.*, 1999).

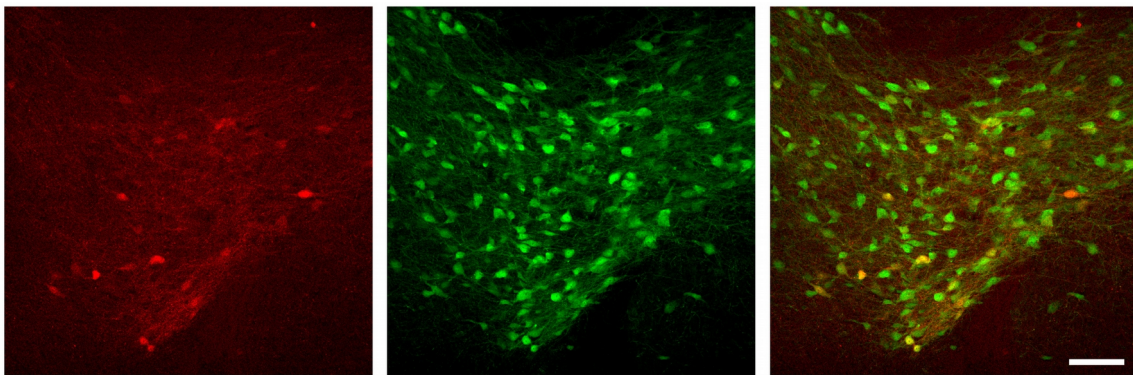


Figura 28. Coexpresión de Td2 y EGFP en el cerebro medio de ratones transgénicos [-5/+10]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP. Imagen confocal de una inmunofluorescencia del cerebro medio coronal. La cantidad de células marcadas para Td2 en cerebro medio es baja en ratones [-5/+10]*Drd2*-Td2 positivos (Rojo). La expresión de *Drd2*-EGFP es típica de D2R (Verde). La marca celular de Td2 colocaliza con EGFP (Derecha; Amarillo). Escala 100 μ m.

3.2. Coexpresión de Td2 y EGFP en ratones transgénicos [+43/+50]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP

El análisis de ratones [+43/+50]*Drd2*-Td2 realizado mediante inmunohistoquímica mostró expresión de Td2 en neuronas del cuerpo estriado, cerebro medio, núcleo arcuato del hipotálamo e hipófisis. En esta parte de la Tesis nos centraremos en el análisis de coexpresión de Td2 y EGFP en estas regiones en ratones transgénicos dobles, *Drd2*-EGFP y [+43/+50]*Drd2*-Td2.

En la Figura 29 se observan imágenes tomadas mediante microscopía de epifluorescencia sobre cortes coronales cerebrales a la altura del núcleo estriado. Si bien la distribución de células positivas para Td2 en el tejido varía entre las dos líneas de ratones [+43/+50]*Drd2*-Td2, la expresión del reportero rojo muestra un alto grado de colocación con neuronas EGFP positivas. En las imágenes magnificadas del núcleo estriado (Figura 29, Est), *accumbens* (Figura 29, Acc) y tubérculo olfatorio (Figura 29, TO), se observa un elevado porcentaje de

coexpresión de ambos reporteros. Debido a que el transgén $[+43/+50]Drd2$ -Td2 funciona con un promotor mínimo heterólogo, los resultados demuestran que la región +43/50 contiene intrínsecamente la capacidad de dirigir la expresión en neuronas estriatales con un alto nivel de penetrancia.

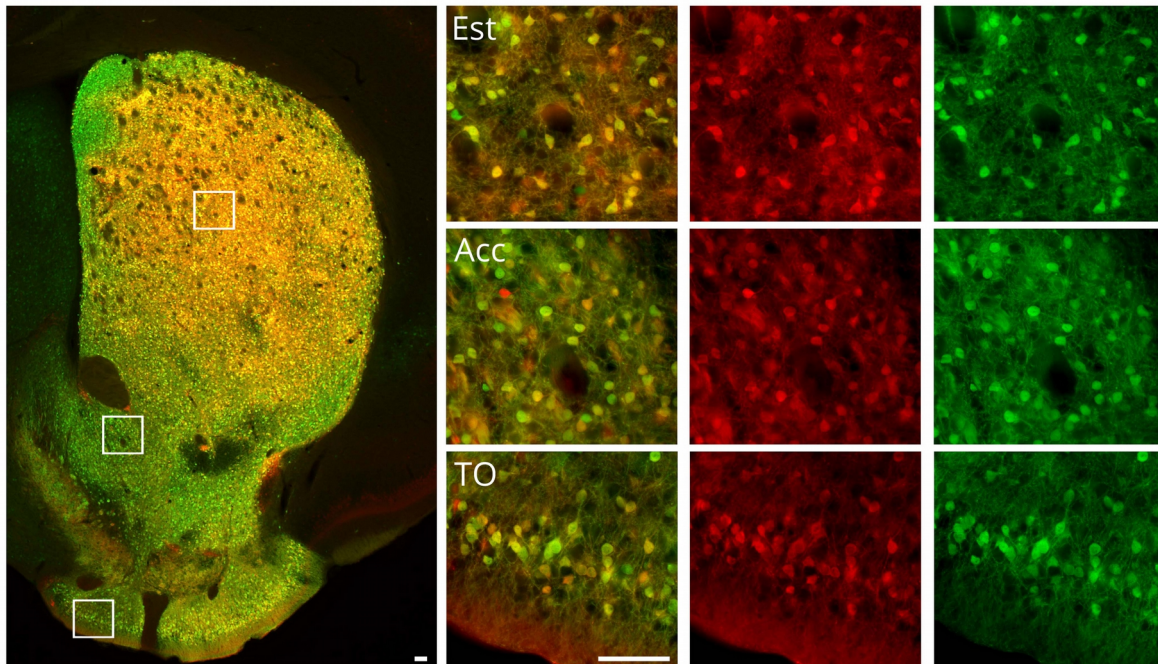


Figura 29. Coexpresión de Td2 y EGFP en el estriado de ratones transgénicos $[+43/+50]Drd2$ -Td2 y $Drd2$ -EGFP. Inmunofluorescencia contra Td2 (Rojo; A1, B1 y C1) y EGFP (Verde; A2, B2 y C2). Sección coronal con ampliaciones en el núcleo estriado (Est), núcleo *accumbens* (Acc), y tubérculo olfatorio (TO). La expresión producida por $[+43/+50]Drd2$ -Td2 muestra altos niveles de colocalización con $Drd2$ -EGFP en los tres núcleos. Escala 100 μ m.

En la Figura 30 se observan cortes coronales inmunofluorescentes de ratones doble transgénicos a diferentes niveles anteroposteriores del cerebro medio y tallo encefálico. En las imágenes de cortes anteriores (Figura 29 A y B) se puede observar la colocalización de los reporteros en la SNc y el VTA, y al ampliar las áreas se muestra la coexpresión de los reporteros en las neuronas. Sin embargo, el VTA parece presentar un mayor número de neuronas que solo expresan EGFP. En cortes más caudales se observa un alto grado de coexpresión en neuronas del campo retrorubral y en menor medida en una subregión del rafe dorsal (Figura 30C). Este último, contiene todas las neuronas serotoninérgicas del cerebro y ha sido vinculado con las conductas depresivas, en parte porque en cerebro de individuos depresivos que cometieron suicidio se observan diferencias en las características morfológicas del rafe dorsal (Arango *et al.*, 2001; Matthews y Harrison, 2012). También se asume que las

disfunciones en el rafe podrían conducir a los trastornos depresivos debido al uso común de los inhibidores de la recaptación de serotonina para su tratamiento (Preskorn, 2006).

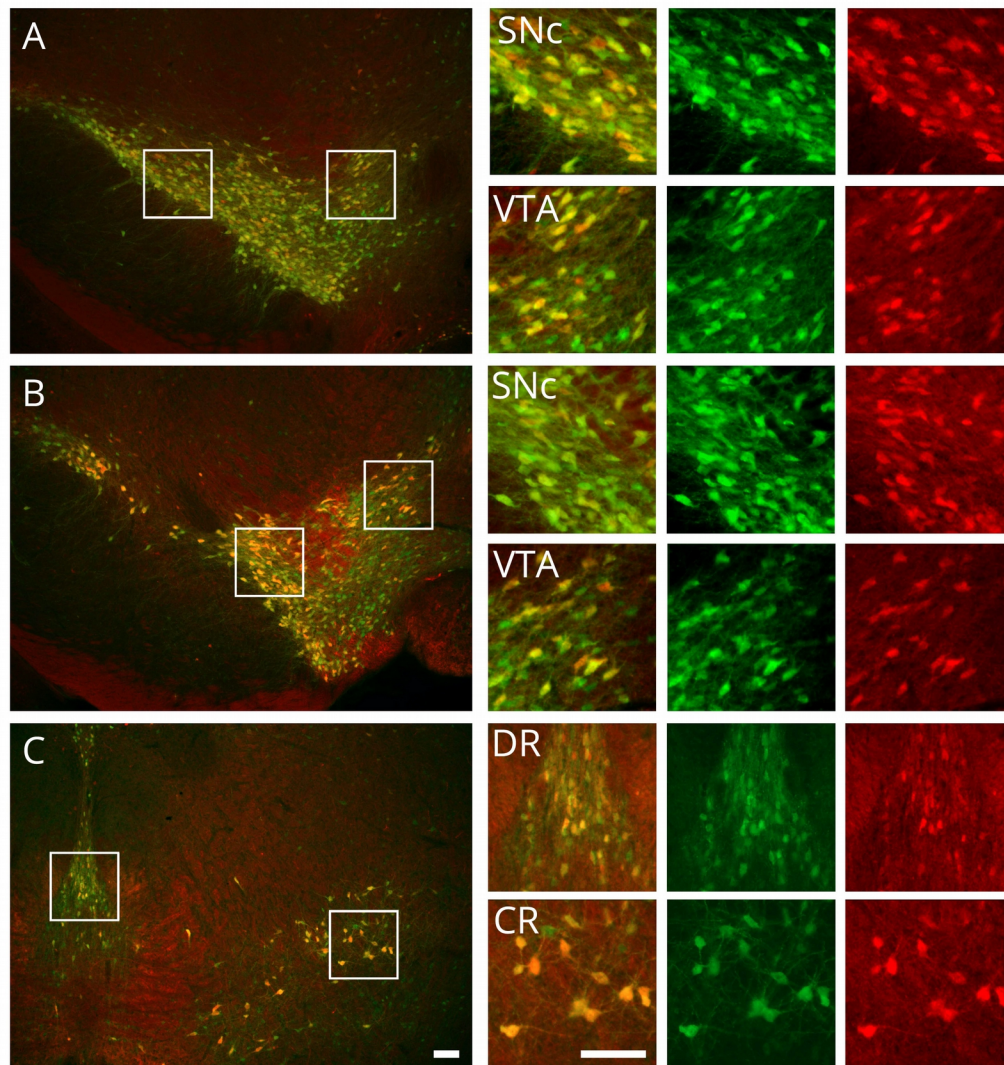


Figura 30. Coexpresión de Td2 y EGFP en el cerebro medio y tallo encefálico de ratones transgénicos [+43/+50]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP. Inmunofluorescencia contra Td2 (Rojo) y EGFP (Verde) en cortes coronales anteroposteriores mostrando el cerebro medio (A-C). Las ampliaciones en A y B muestran colocalización celular entre las proteínas reporteras en la SNc y VTA. Las ampliaciones en C muestran colocalización en el rafe dorsal (DR) y en el campo retrorubral (CR). Escala 100 μ m.

Como mostramos anteriormente, el transgén [+43/+50]*Drd2*-Td2 también dirige la expresión en el núcleo arcuato del hipotálamo. En la Figura 31 se muestra una imagen epifluorescente de un corte coronal magnificando la región. Observamos que los reporteros se coexpresan en células presentes en el núcleo, siendo la distribución de células Td2 positivas menor que las que expresan EGFP.

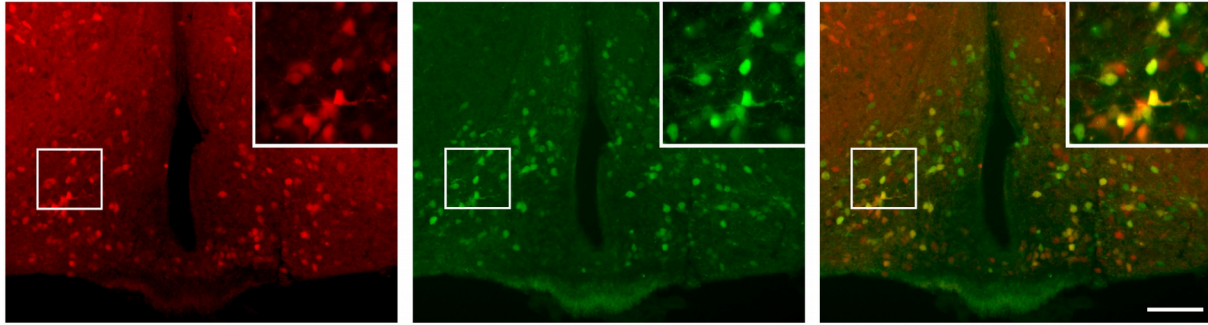


Figura 31. Coexpresión de Td2 y EGFP en el núcleo arcuato de ratones transgénicos [+43/+50]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP. Inmunofluorescencia en cortes coronales contra Td2 (Rojo) y EGFP (Verde) donde se muestra colocalización en el núcleo arcuato (Amarillo; Derecha). Escala 100 μ m.

El transgén [+43/+50]*Drd2*-Td2 también dirige la expresión de Td2 en la hipófisis medial y anterior. En la Figura 32 se muestra una imagen epifluorescente de una sección coronal de la hipófisis. Tanto Td2 como EGFP se expresan intensamente en melanotropos del lóbulo intermedio. En el lóbulo anterior, la distribución de Td2 y EGFP parece ser diferente, con un bajo número de células expresando claramente ambos reporteros. Las células conteniendo la proteína roja se concentran en la periferia del lóbulo, en cambio las células que expresan EGFP se distribuyen tanto en las áreas periféricas como centrales.

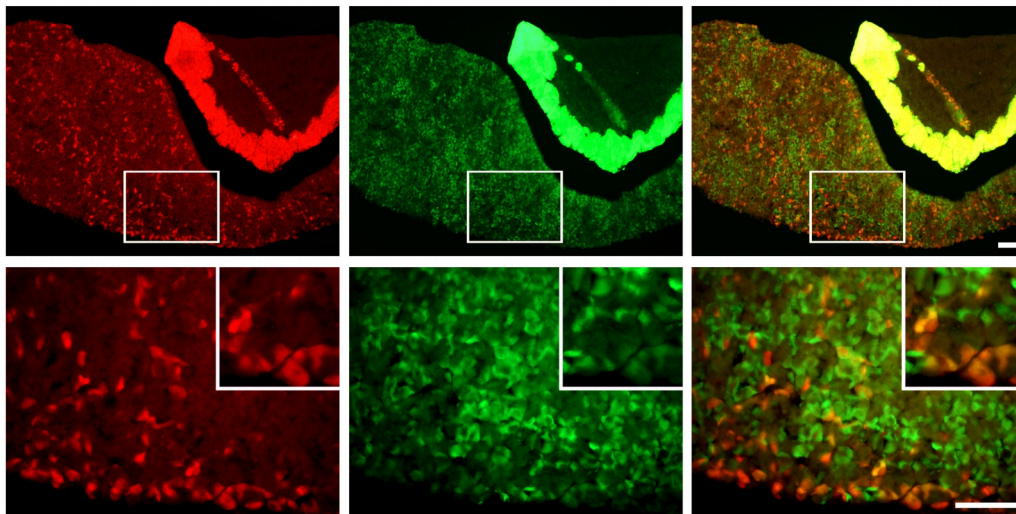


Figura 32. Coexpresión de Td2 y EGFP en la hipófisis de ratones transgénicos [+43/+50]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP. Inmunofluorescencia contra Td2 (Rojo) y EGFP (Verde) en hipófisis de ratones portando ambos transgenes. Arriba: en imágenes de bajo poder se observa expresión de ambas proteínas reporteras en el lóbulo intermedio y anterior. Abajo: imágenes de alto poder en el lóbulo anterior muestran una baja colocalización de Td2 y EGFP. Escala 100 μ m.

Para analizar si las células Td2 positivas pertenecen al grupo celular que expresan D2R en la hipófisis realizamos una inmunomarcación fluorescente contra prolactina, la hormona secretada

por los lactotropos. En la Figura 33 puede observarse que Td2 no se expresa en células que secretan prolactina. Este resultado indicaría que la expresión del transgén [+43/+50]*Drd2*-Td2 en la hipófisis anterior no es específica de células D2R. Como esta expresión es muy similar en las dos líneas de ratones [+43/+50]*Drd2*-Td2, la expresión ectópica de este transgén en el lóbulo hipofisario anterior probablemente se deba a la presencia de un enhancer aún desconocido presente en las secuencias de *Pomc* utilizadas para su construcción.

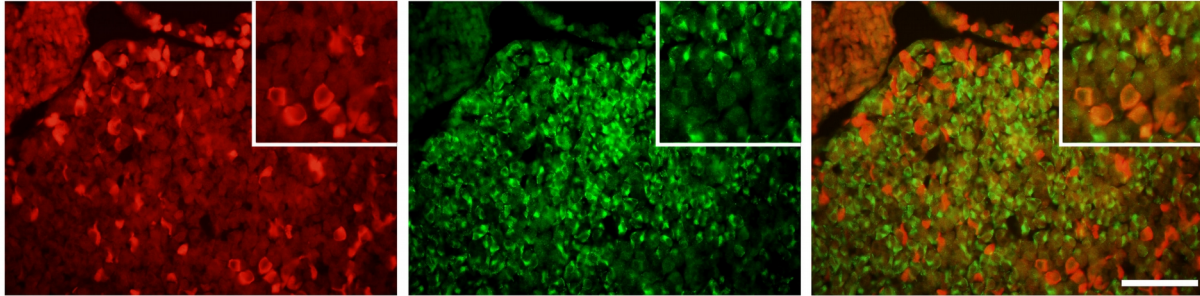


Figura 33. Los lactotropos de ratones [+43/+50]*Drd2*-Td2 positivos no expresan Td2. Inmunofluorescencia contra prolactina (Verde) y Td2 (Rojo) en cortes coronales de hipófisis de ratones transgénicos, en donde no se observa colocalización entre los marcadores. Escala 100 μ m.

En resumen, los resultados de esta sección indican que el fragmento genómico de 2 kb localizado entre +43 y +45 kb contiene *enhancers* transcripcionales que regulan la expresión de *Drd2* en áreas del cerebro en donde el receptor tiene una importancia fisiológica probada. Estos hallazgos son de potencial relevancia, ya que el núcleo estriado, el *accumbens* y el tubérculo olfatorio son las áreas del cerebro de mayor expresión del D2R.

4. Análisis de expresión del promotor proximal de *Drd2*

En los puntos anteriores mostramos la capacidad del fragmento genómico -5/+10 para dirigir la expresión en el cerebro, principalmente en neuronas septales, de la corteza y de la hipófisis medial. Para estudiar más en detalle las propiedades transcripcionales de la región promotora generamos una delección río abajo del primer exón de *Drd2* dejando 64 pb del extremo 5' del primer intrón. Al igual que en el transgén [-5/+10]*Drd2*-Td2, incluimos una porción de 428 pb de la región 3' del primer intrón seguida del segundo exón para construir un mini-intrón 1 que aumente la eficiencia transcripcional del transgén y permita mayores niveles de expresión de Td2 (Figura 34). Con esta construcción, [-5/0]*Drd2*-Td2, generamos 4 líneas de ratones transgénicos.

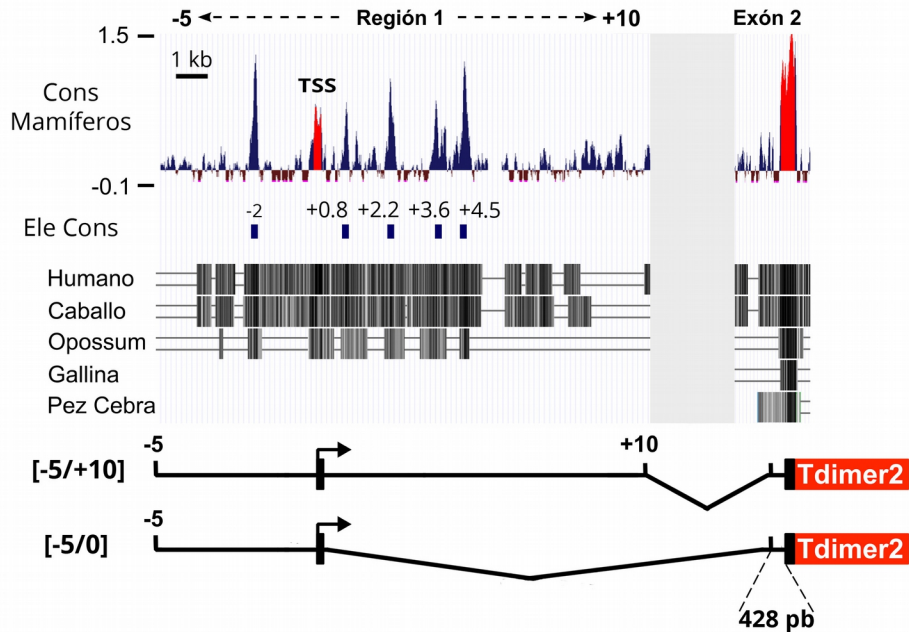


Figura 34. Elementos conservados en la unidad transcripcional de *Drd2* incluidos en los transgenes [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+50]*Drd2*-Td2. A diferencia de [-5/+10]*Drd2*-Td2 el transgén [-5/0]*Drd2*-Td2 se encuentra compuesto principalmente por la región de 5 kb río arriba del TSS. Los dos transgenes comparten 64 pb intrónicos río abajo del TSS y 428 pb río arriba del exón 2.

En la Figura 35 A-E se muestran cortes sagitales de cerebro inmunomarcados para Td2 de un animal [-5/0]*Drd2*-Td2. A diferencia de los transgenes que contienen la región intrónica de 10 kb río abajo del primer exón, Td2 no se expresa en las regiones septales y prefrontales, como tampoco en las áreas dopaminérgicas del cerebro medio (Figura 35A-C). Este análisis delecional indica que los elementos de regulación transcripcional que dirigen la expresión en estas áreas del cerebro estarían en la región 0/+10. Por otro lado, una de las líneas [-5/0]*Drd2*-Td2 produce expresión en el estriado (Línea 690), principalmente en neuronas de gran tamaño dispersas en el tejido (Figura 35 D y E). Si bien es sólo una línea, llama la atención que dicha expresión sea comparable a la observada en una de las líneas del transgén [-5/+10]*Drd2*-Td2 (Línea 850; Figura 35F).

El análisis comparativo de la expresión de Td2 en el cerebro de ratones de las cuatro líneas [-5/0]*Drd2*-Td2 positivas no mostró tener un patrón definido y consistente en relación a lo observado para *Drd2*-EGFP. Así la distribución de Td2 en el cerebro producida por [-5/0]*Drd2*-Td2 pareció ser muy dependiente de cada evento de transgénesis, indicando posibles efectos posicionales no específicos. Sin embargo, la presencia de Td2 en un grupo de neuronas de gran tamaño y dispersas en el núcleo estriado en la línea 690 es particularmente llamativa, ya que su morfología es típica de las interneuronas colinérgicas estriatales (Alcantara *et al.*, 2003). Consistente con este estudio, en un trabajo en el que se realizaron ablaciones condicionales de

neuronas estriatales que expresan *Drd2* también se observó la pérdida de neuronas colinérgicas (Sano *et al.*, 2003).

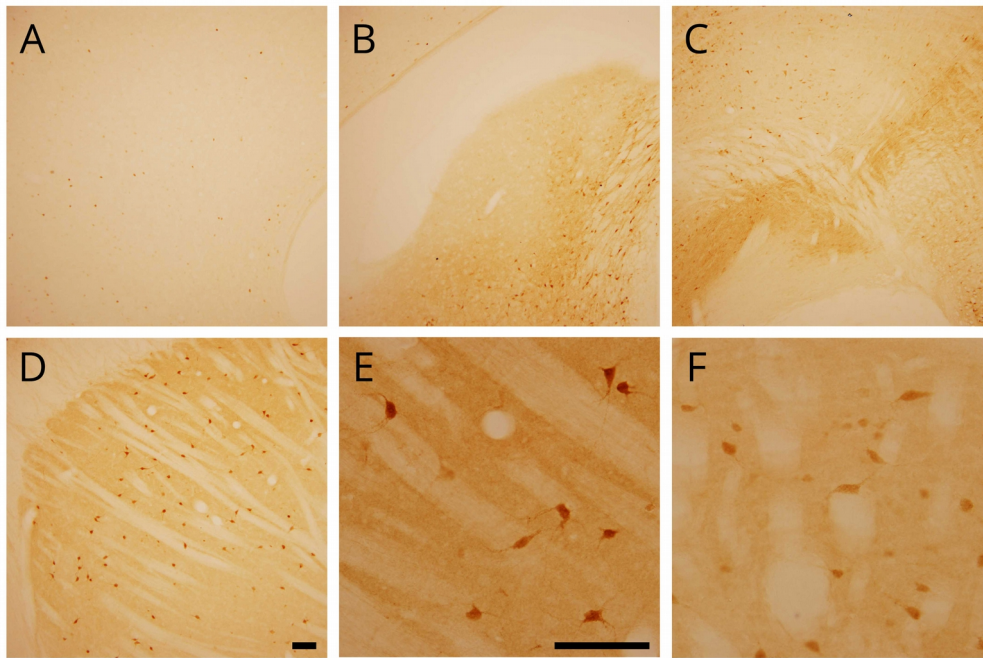


Figura 35. Expresión de Td2 en cerebro de ratones transgénicos [-5/0]*Drd2*-Td2 y [-5/+10]*Drd2*-Td2. Inmunohistoquímica contra Td2 en cortes sagitales (A-D) y un corte coronal (F) de cerebro de una línea de ratones [-5/+10]*Drd2*-Td2 positivos (A-E) y la línea 690 de ratones [5/+10]*Drd2*-Td2 positivos (F). No se observa expresión del reportero en la mPFC (A), el *septum* (B), ni en el cerebro medio (C). Sí en neuronas estriatales (D y su ampliación E). La línea 850 de ratones [-5/+10]*Drd2*-Td2 también produce un patrón de expresión similar (F). Escala 100 μ m.

Para analizar si las neuronas estriatales Td2 positivas son colinérgicas realizamos experimentos de doble inmunofluorescencia contra la enzima colina acetil transferasa (ChAT) y Td2. Debido a que al momento de este análisis sólo contábamos con muestras tomadas de ratones dobles transgénicos [-5/0]*Drd2*-Td2/*Drd2*-EGFP (línea 690) y [-5/10]*Drd2*-Td2/*Drd2*-EGFP (línea 850), la inmunomarcación fluorescente verde contra ChAT también presenta señal proveniente de la expresión de *Drd2*-EGFP. Sin embargo, los niveles de *Drd2*-EGFP en neuronas colinérgicas estriatales son sensiblemente menores a los observados en MSNs (Figura 36 G-H)

En la Figura 36 A-C se observa una imagen confocal estriatal de un ratón doble transgénico [-5/0]*Drd2*-Td2 (Línea 690) y *Drd2*-EGFP. En el corte sagital se pueden observar grandes neuronas marcadas tanto en el canal rojo (Td2) como en el verde (ChAT más la expresión de *Drd2*-EGFP). Este resultado se reproduce en la línea de ratones dobles transgénicos [-5/+10]*Drd2*-Td2 (Línea 850) y *Drd2*-EGFP positivos en la que se observa expresión estriatal de Td2 (Figura 36 D-F). Estas observaciones, junto con el mayor tamaño y la morfología de las

células Td2 positivas, indican que las neuronas inmunomarcadas contra Td2 en ratones $[-5/0]Drd2$ -Td2 y $Drd2$ -EGFP positivos son neuronas colinérgicas que expresan Td2.

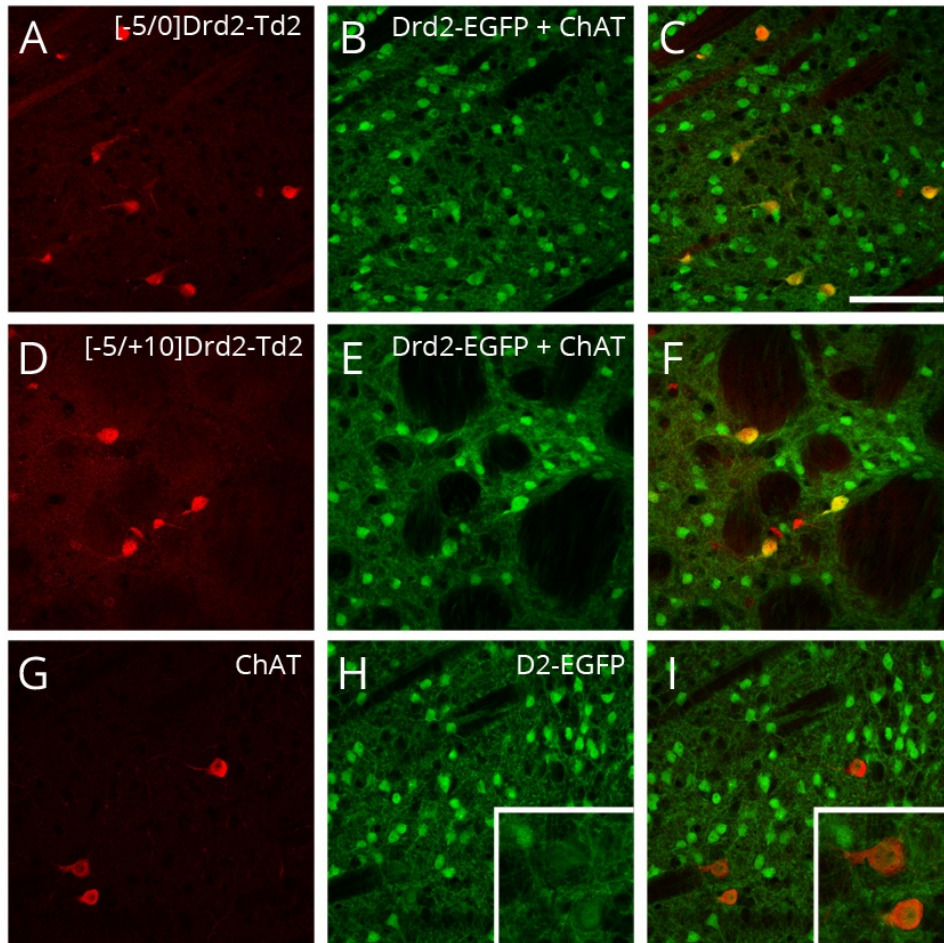


Figura 36. La región -5/0 dirige la expresión de Td2 en neuronas colinérgicas estriatales. Imágenes confocales correspondientes a inmunomarcación fluorescente en estriado. **A-F.** Inmunofluorescencia doble contra Td2 (Rojo), y contra ChAT (Verde; también se observa *Drd2*-EGFP) en cortes sagitales de estriado de la línea 690 ($[-5/0]Drd2$ -Td2) y *Drd2*-EGFP positiva (A-C), y cortes coronales de la línea 850 ($[-5/+10]Drd2$ -Td2) y *Drd2*-EGFP positiva (D-F); **G-I.** Inmunofluorescencia contra ChAT (Rojo) y fluorescencia natural de EGFP (Verde) en ratones *Drd2*-EGFP positivos. Escala 100 μ m.

En la hipófisis, observamos que 3 de las 4 líneas de ratones transgénicos $[-5/0]Drd2$ -Td2 reprodujeron el patrón de expresión observado previamente para $[-5/+10]Drd2$ -Td2. En la Figura 37 se observa una imagen epifluorescente de la hipófisis de un ratón doble transgénico $[-5/0]Drd2$ -Td2 y *Drd2*-EGFP. La expresión de Td2 se concentra en el lóbulo intermedio donde se encuentran los melanotopos, coincidiendo con la marca de EGFP. Particularmente esta línea muestra una expresión ectópica exacerbada en la hipófisis anterior que no coincide con el patrón de expresión de *Drd2*-EGFP, y que tampoco se repite en las demás líneas. Consistente

con esta observación, es importante remarcar que ninguna de las líneas [-5/+10]*Drd2*-Td2 produjo expresión en el lóbulo anterior pero sí en el medial.

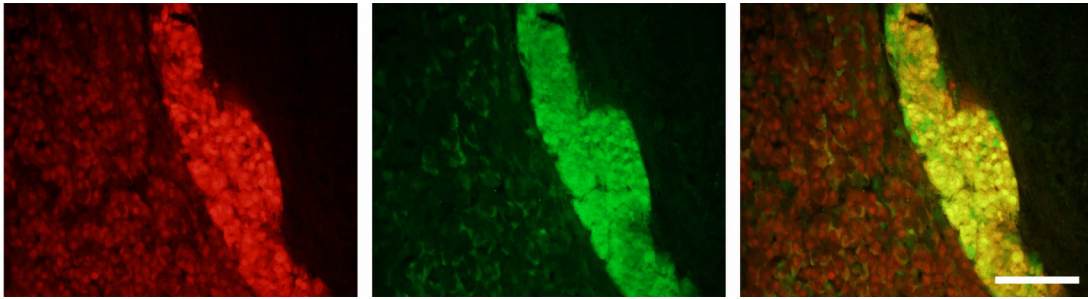


Figura 37. Coexpresión de Td2 y EGFP en la hipófisis de ratones [-5/0]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP positivos. Imágenes epifluorescentes tomadas en cortes coronales de hipófisis inmunomarcadas contra Td2 (Rojo) y EGFP (Verde). La colocalización entre las proteínas puede observarse en la imagen superpuesta (Derecha; Amarillo). Escala 100 μ m.

En resumen, los resultados obtenidos con el transgen [-5/0]*Drd2*-Td2 parecerían indicar que la región de 5 kb puesta a prueba no contiene los *enhancers* transcripcionales que dirigen la expresión al *septum*, la mPFC, y el cerebro medio. Esta observación sugiere fuertemente que estas regiones regulatorias se encontrarían en la región 0/+10. Por otro lado, el fragmento -5/0 poseería al menos un elemento regulatorio que dirige la expresión a la hipófisis intermedia. Finalmente, si bien una sola línea [-5/0]*Drd2*-Td2 expresa la proteína reportera en neuronas colinérgicas, la existencia de una línea de ratones [-5/+10]*Drd2*-Td2 con un patrón de expresión idéntico en estas interneuronas estriatales fortalece la hipótesis de que el fragmento de 5 kb río arriba del TSS de *Drd2* contiene un *enhancer* capaz de dirigir la expresión en este tipo neuronal.

5. *Footprinting* filogenético y epigenético de las regiones -5/+10 y +43/+50

Los resultados observados en ratones transgénicos [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2 sugieren fuertemente que las regiones genómicas analizadas contienen *enhancers* transcripcionales que controlan la expresión de *Drd2* en el cerebro y la hipófisis. Para identificar potenciales *enhancers* dentro de estas regiones realizamos análisis bioinformáticos basados en la detección de secuencias conservadas que evidencian una mayor presión de selección y de marcas epigenéticas presentes en las histonas en tejido cerebral asociadas a *enhancers* activos.

Para analizar la conservación de estas regiones génicas utilizamos los alineamientos depositados en el ensamble del genoma humano (GRCh37/hg19) mediante la plataforma *Genome Browser* de la Universidad de California en Santa Cruz que permite comparar

secuencias de 100 genomas de animales vertebrados, 60 especies más que las permitidas en el ensamble de ratón (NCBI37/mm9). Para identificar elementos ortólogos conservados utilizamos las secuencias humanas alineadas sobre el genoma murino en las regiones -5/+10 y +43/+50 del ensamble mm9. En la Figura 38A se muestran los niveles de conservación determinados por PhyloP. Este gráfico es similar al producido por PhyloP en el alineamiento de mamíferos placentarios que usa como referencia el genoma de ratón (Figura 18A).

Los elementos conservados localizados en -2, +2, +3,6 y +4,5 kb respecto del TSS de *Drd2* poseen fragmentos de secuencias alineadas entre mamíferos placentarios y marsupiales, mientras que el elemento presente a +0,8 kb parece tener menor identidad con marsupiales (Figura 38B). Si bien la región que contiene el primer exón presenta secuencias alineadas entre humano, cocodrilo y el pájaro pinzón cebrado, es posible que sea consecuencia de errores en el alineamiento ya que están anotadas como secuencias presentes en otros cromosomas o regiones genómicas muy distantes. Al observar los niveles de conservación determinados por PhyloP y el tamaño de los fragmentos alineados, de los 5 elementos conservados en la región -5/+10, los elementos -2 y +4,5 presentan mayor densidad de secuencias conservadas. Estos dos elementos son los que tienen mayor puntaje de conservación en la región -5/+10 según PhasCons (Tabla 3A). El elemento +4,5 es el más conservado con un tamaño de 117 pb y un puntaje de 600 sobre un máximo de 1000. El elemento -2 de 62 pb tiene un puntaje de 549. En tercer lugar se encuentra el primer exón con un tamaño de 59 pb y un puntaje de 511. Por debajo quedan los elementos 0,8, 2,2 y 3,6, con puntajes de 385, 490 y 504, respectivamente.

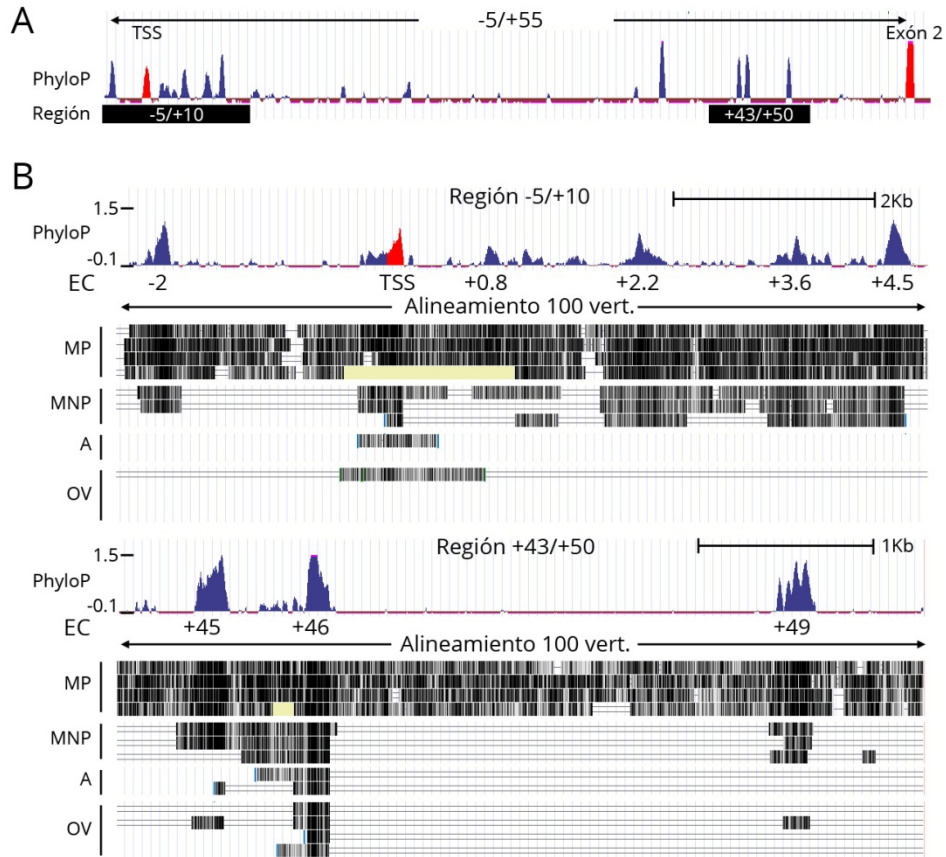


Figura 38. Elementos conservados del gen *DRD2* incluidos en las regiones -5/+10 y +43/+50.

A. Conservación según PhyloP en el alineamiento de 100 vertebrados de la región de *DRD2* -5/+55 -obtenida de *Genome Browser* (UCSC)- en el ensamble de humano (GRCh37/hg19). **B.** Alineamientos múltiples de 100 vertebrados sobre las regiones -5/+10 y +43/+50 en el genoma de humano. Se indican los elementos conservados homólogos de ratón (EC). En el alineamiento se muestra la identidad usando un gráfico de densidad en escala de grises (los bloques más oscuros indican mayor conservación). Se muestran las especies más representativas en el siguiente orden: Mamíferos placentarios (MP): ratón, caballo, elefante, armadillo; Mamíferos no placentarios (MNP): *opossum*, demonio de Tasmania, *wallaby*; Aves (A): pinzón cebra, pavo; Otros vertebrados (OV): cocodrilo americano, tortuga de mar verde, tortuga china de caparazón blando.

En la región +43/+50, como mencionamos anteriormente, hay tres elementos altamente conservados que nombramos como +45, +46 y +49, según su posición respecto del TSS de *Drd2* (Figura 38B). Al observar los alineamientos sobresale el elemento +46 que posee un fragmento con secuencias genómicas alineadas entre mamíferos y otros vertebrados como el pavo, el cocodrilo, la tortuga, y el lagarto. Siguiendo con el análisis cualitativo se observa que los elementos +45 y +49 poseen fragmentos de secuencias alineadas entre la mayoría de los mamíferos placentarios y marsupiales, pero poseen una menor cantidad de secuencias genómicas alineadas con otros vertebrados al comparar con +46. Tal es así que el elemento +46, de 67 pb, posee una alta conservación con un puntaje de 596 determinado por PhastCons (Tabla 3B). Después le sigue el elemento +45 que tiene dos fragmentos conservados con un

puntaje de 542 (64 pb) y 552 (65 pb). Finalmente el elemento +49 es el menos conservado con un puntaje de 535 (61 pb).

A) Elementos conservados en la región -5/+10 (por PhastCons)

Posición (GRCh37/hg19)	Puntaje	Tamaño (pb)	Elemento
chr11: 113348106-113348168	549	62	-2
chr11:113345792-113345851	511	59	Exón1 (TSS)
chr11:113344916-113344961	385	45	+0.8
chr11:113343407-113343469	504	62	+2.2
chr11:113341856-113341917	490	61	+3.6
chr11:113340850-113340967	600	117	+4.5

B) Elementos conservados en la región +43/+50 (por PhastCons)

Posición (GRCh37/hg19)	Puntaje	Tamaño (pb)	Elemento
chr11:113306577-113306641	542	64	+45
chr11:113306510-113306575	552	65	+45
chr11:113306000-113306067	596	67	+46
chr11:113303198-113303259	535	61	+49

Tabla 3. Elementos conservados en las regiones -5/+10 y +43/+50 determinados por PhastCons en alineamiento de 100 vertebrados. Elementos de mayor conservación en las regiones -5/+10 (A) y +43/+50 (B) ordenados según su localización en el cromosoma 11 de humano. Puntaje determinado por PhastCons sobre el alineamiento de 100 vertebrados (0-1000) y tamaño del elemento.

En los últimos años, el análisis de marcas epigenéticas combinado con tecnologías de secuenciación de última generación, brindaron un panorama más detallado de la relación entre la estructura cromatínica y la actividad de promotores y *enhancers* transcripcionales. Actualmente, es posible predecir con cierto grado de confianza la existencia de un *enhancer* cercano a un gen, y si se encuentra activo o inactivo, a partir de las marcas epigenéticas asociadas a su localización genómica (Nord *et al.*, 2015). Dentro de las marcas más estudiadas en los procesos de regulación génica están las modificaciones post-traduccionales de las histonas. Dos de estas modificaciones son de particular interés en la búsqueda de *enhancers*, la metilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me1) (Heintzman *et al.*, 2007) y la acetilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27ac) que actualmente se considera una modificación que permite diferenciar, junto con la H3K4me1, los *enhancers* activos de los inactivos (Creyghton *et al.*, 2010).

En un estudio realizado por Shen *et al.* (2012) se mapearon 19 tejidos y tipos celulares en búsqueda de la localización genómica de la ARN polimerasa II, del factor de unión a CCCTC, y de tres modificaciones cromatínicas (H3K4me1, H3K4me3 y H3K27ac). Entre los 19 tejidos estudiados en este trabajo, el cerebro de embriones murinos de 14,5 días es el de mayor

utilidad para el análisis de marcas epigenéticas en la búsqueda de *enhancers* del *Drd2* que actúan en el sistema nervioso central. Pero debido a que el cerebro contiene una gran cantidad de tipos celulares, también es posible que las marcas histónicas vinculadas a la expresión de *Drd2* en un tipo celular no muy abundante se encuentren por debajo del límite de detección. Para su fácil acceso, estos datos de enriquecimiento del ChIP-Seq normalizados fueron depositados en la base de datos pública del *Genome Browser* de UCSC por el laboratorio del Dr. Ren, y pueden ser observados en el ensamble de ratón mm9.

Al observar las señales de los ChIP-Seq de las marcas de las histonas H3K4me1, H3K4me3 y H3K27ac, tres regiones llaman la atención por sus niveles de lecturas (Figura 39A). La región centrada entre las posiciones -5/+10 presenta señales elevadas de H3K4me1 y H3K4me3, más precisamente ubicadas sobre la región promotora de *Drd2*, donde se encuentra el TSS. También se observan dos picos de lecturas de H3K4me1 pequeños fuera de la región promotora que coinciden con los elementos más conservados hallados en la región, el -2 y el +4,5 (Figura 39B).

También se observan marcas de histonas modificadas entre las posiciones +43 y +50. Particularmente, un pico de señal de la marca H3K4me1 coincide con el elemento conservado +46 (Figura 39B). También pueden observarse lecturas de H3K4me1 sobre el elemento +49 pero en menor cantidad. Por otro lado, la porción central del elemento +45 no presenta lecturas de ChIP-Seq de histonas, pero sí dos picos vecinos con señal de H3K4me1. La marca de H3K27ac presenta bajos niveles en esta región concentrándose principalmente cerca de los elementos +45 y +46.

Si bien nuestro objetivo principal es la identificación de *enhancers* en los fragmentos genómicos utilizados en los ensayos de expresión en los puntos anteriores, otra región que presenta histonas modificadas se encuentra en el centro del primer intrón entre las posiciones +18/+28. Principalmente se observan picos de señal de H3K4me1 y baja señal de H3K27ac (Figura 39A), indicando que esta región a pesar de no encontrarse muy conservada podría tener algún rol en la regulación transcripcional de *Drd2*, por lo que deberíamos tenerla en cuenta en estudios futuros.

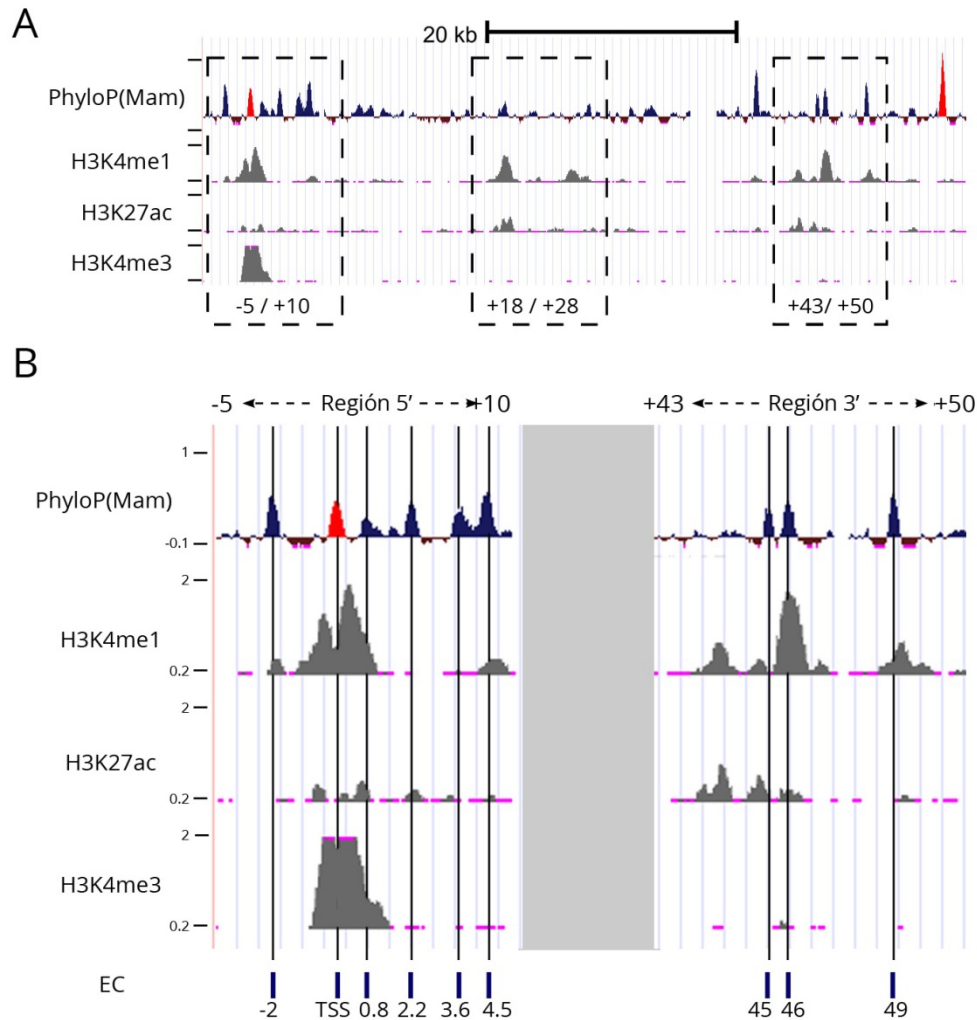


Figura 39. Modificaciones epigenéticas vinculadas a *enhancers* en la región -5/+55. A. Las señales se concentran en las regiones -5/+10, +18/+28 y +43/+50 indicando posibles elementos regulatorios. **B.** Regiones -5/+10 y +43/+50 ampliadas donde se señalan los elementos conservados estudiados y sus modificaciones histónicas asociadas. Los datos se encuentran normalizados por la cantidad de lecturas y cada punto en el gráfico representa el delta de la intensidad de señal de inmunoprecipitación normalizada menos la intensidad de señal del *input* normalizada. A modo de comparación se presenta la conservación en mamíferos determinada por PhyloP.

Como resultado de la combinación del análisis de conservación y de las marcas epigenéticas, podemos concluir que el fragmento genómico en el que se encuentra el elemento +46 presenta características óptimas para ser considerado como uno de los principales candidatos para controlar la expresión en el cerebro. Los elevados niveles de conservación entre vertebrados y su asociación con la marca H3K4me1 nos permiten inferir que tendría una elevada importancia en la regulación transcripcional del receptor D2. Los otros dos elementos conservados en la región +43/+50 resultaron muy similares al evaluar su estado de conservación y marcas de las histonas, siendo el elemento +45 cuantitativamente (según el puntaje otorgado por PhastCons) un poco más conservado entre vertebrados que el +49.

En la región -5/+10 los elementos -2 y +4,5 mostraron elevados niveles de conservación entre mamíferos placentarios y marsupiales. Las marcas de H3K4me1 asociadas no son elevadas pero podrían indicar algún rol regulatorio en estos elementos. Por otro lado, la región centrada en el primer exón se encuentra fuertemente asociada a H3K4me3, lo que es esperable para un promotor transcripcional.

6. Los elementos conservados +45 y +46 dirigen la expresión de Td2 de manera diferencial al estriado y al cerebro medio

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de conservación y marcas epigenéticas, los elementos conservados +45 y +46 resaltan como los candidatos más promisorios para continuar con los ensayos de expresión en ratones. El análisis informático del elemento +46 indica que es el más conservado entre vertebrados y que también estaría asociado a una región que inmunoprecipita con un anticuerpo anti-H3K4me1 sugiriendo fuertemente su rol como *enhancer* transcripcional. El elemento +45 también presenta una elevada conservación, principalmente entre mamíferos, y debido a que la región +43/+50 es capaz de dirigir expresión de reporteros al estriado y al cerebro medio resulta de elevado interés lograr individualizar los *enhancers* que dominan estas dos regiones.

Para estudiar los elementos conservados +45 y +46 utilizamos el mismo vector reportero que contiene el promotor mínimo de TK. Los elementos se clonaron río arriba de TK en fragmentos de 500 pb centrados en la región de mayor conservación. Los transgenes resultantes, [+45]*Drd2*-Td2 y [+46]*Drd2*-Td2, se utilizaron para generar ratones transgénicos, dando lugar a 3 líneas para el primer transgén y 4 para el segundo. De la misma forma que en los ensayos anteriores, los ratones fundadores se cruzaron con ratones *Drd2*-EGFP para verificar si la expresión de Td2 en el cerebro genera patrones de expresión consistentes con los observados para *Drd2*.

Los resultados de estos ensayos mostraron que los ratones transgénicos [+45]*Drd2*-Td2 expresan Td2 en la SNc y el VTA de la misma forma que *Drd2*-EGFP. Los ratones [+46]*Drd2*-Td2, por el contrario, no expresan Td2 en el cerebro medio. En la Figura 40A se observan imágenes de epifluorescencia de cortes coronales comparando el cerebro medio de ratones *Drd2*-EGFP, [+45]*Drd2*-Td2 y [+46]*Drd2*-Td2 en donde se observa que sólo *Drd2*-EGFP y el transgén con el elemento conservado +45 expresan en el cerebro medio con los patrones esperados para D2R. Mediante microscopía confocal en ratones doble transgénicos, *Drd2*-EGFP y [+45]*Drd2*-Td2, se puede observar que las proteínas reporteras presentan un alto grado

de coexpresión en neuronas en la SNc, mostrando el elemento +45 un alto grado de especificidad en esta área (Figura 40B).

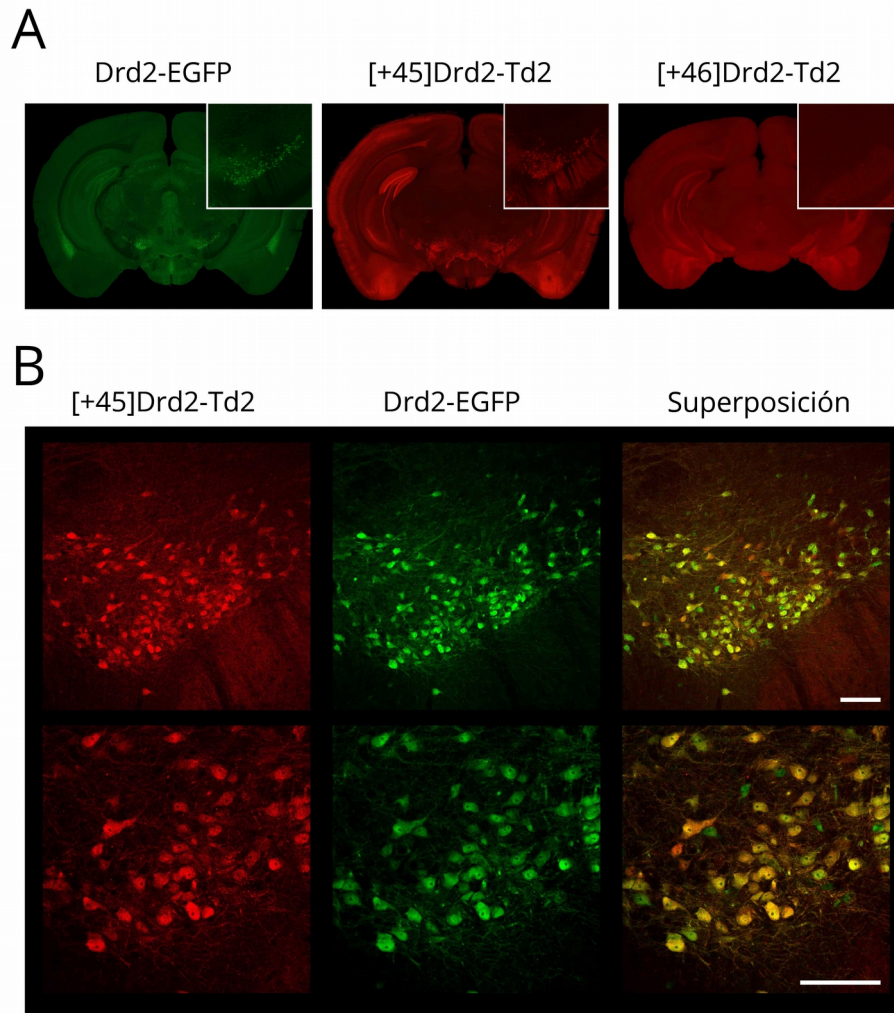


Figura 40. El transgén **[+45]Drd2-Td2** dirige la expresión al cerebro medio. Inmunofluorescencia contra Td2 (Rojo) y EGFP (Verde) **A.** Imágenes epifluorescentes a bajo poder de cortes coronales del cerebro medio ampliando el área dopaminérgica comparando la expresión de los dos transgenes. **B.** Imágenes confocales de la SNc de ratones transgénicos para **[+45]Drd2-Td2** y **Drd2-EGFP**. Escala 100 μ m.

Un análisis de expresión más detallado a diferentes niveles coronales del cerebro medio y tallo muestra que la expresión de Td2 en ratones **[+45]Drd2-Td2** se distribuye a lo largo de las tres áreas dopaminérgicas del cerebro medio coexpresándose con **Drd2-EGFP**. Las neuronas localizadas en la SNc presentan un alto grado de coexpresión de ambos reporteros (Figura 41 A y B). Las neuronas del VTA localizadas más ventromedialmente, que expresan EGFP, presentan niveles bajos o nulos de Td2 (Figura 41, VTA en A y B). Por otro lado, los ratones **[+45]Drd2-Td2** expresaron de Td2 en el campo retrorubral y en el núcleo dorsal del rafe

coincidiendo con la fluorescencia verde observada en ratones *Drd2*-EGFP (Figura 41C). Estos resultados son muy similares a los mostrados anteriormente al estudiar la región +43/+50 (Figura 30).

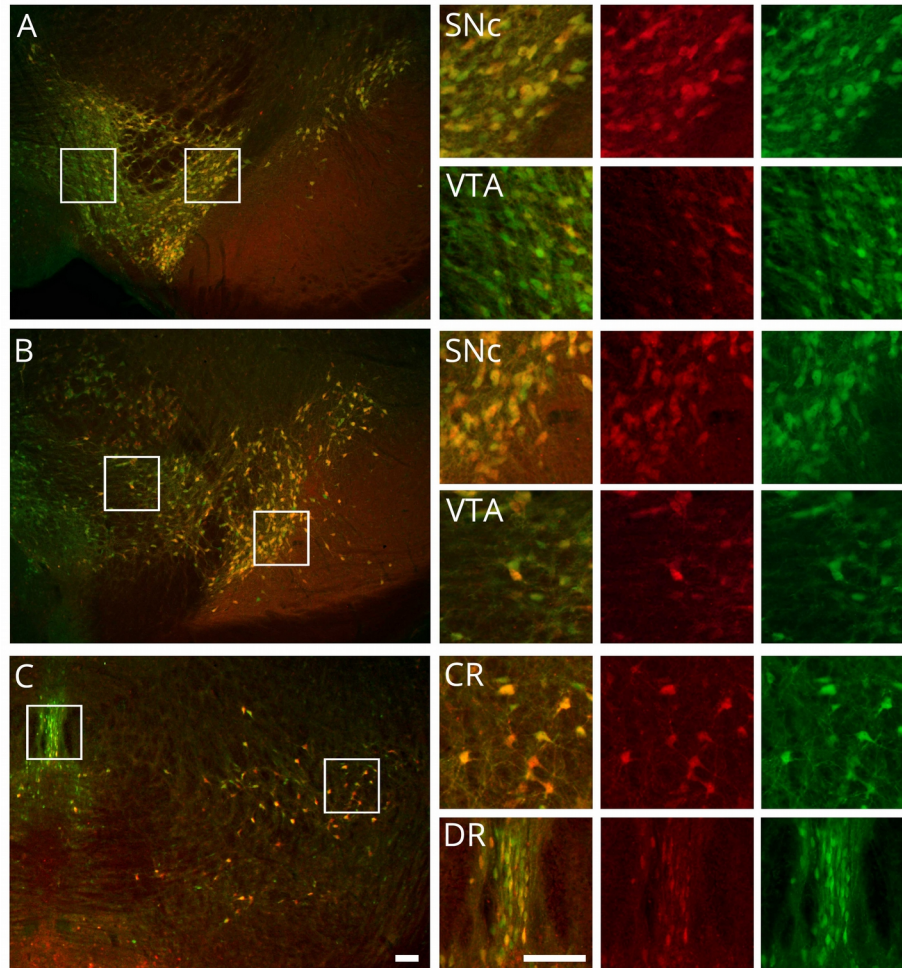


Figura 41. Coexpresión de Td2 y EGFP en el cerebro medio y tallo de ratones transgénicos [+45]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP. Inmunofluorescencia contra Td2 (Rojo) y EGFP (Verde) en cortes coronales anteroposteriores mostrando el cerebro medio y tallo (A-C). Las ampliaciones en A y B muestran colocalización celular entre las proteínas reporteras en la SNc y VTA. Las ampliaciones en C muestran colocalización en el rafe (DR) y el campo retrorubral (CR). Escala 100 μ m.

El análisis de expresión de Td2 en el cuerpo estriado resultó muy diferente en ratones transgénicos [+45]*Drd2*-Td2 y [+46]*Drd2*-Td2. En la Figura 42A se analiza la expresión de Td2 y EGFP en cortes de cerebros coronales a la altura del estriado de ratones dobles transgénicos [+45]*Drd2*-Td2/*Drd2*-EGFP y [+46]*Drd2*-Td2/*Drd2*-EGFP. Se observa que los patrones de expresión producidos por el transgén con el elemento +46 son similares a los generados por *Drd2*-EGFP mientras que los ratones transgénicos [+45]*Drd2*-Td2 no muestran expresión de Td2 en esta región. También observamos que los transgenes con los elementos conservados +45 y +46 producen expresión en la corteza cerebral, señal que no coincide con la expresión de

EGFP en ratones *Drd2*-EGFP. Mediante microscopía confocal encontramos que las proteínas reporteras expresadas en el estriado de ratones dobles transgénicos [+46]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP localizan en las mismas células mostrando un alto nivel de coexpresión (Figura 42B).

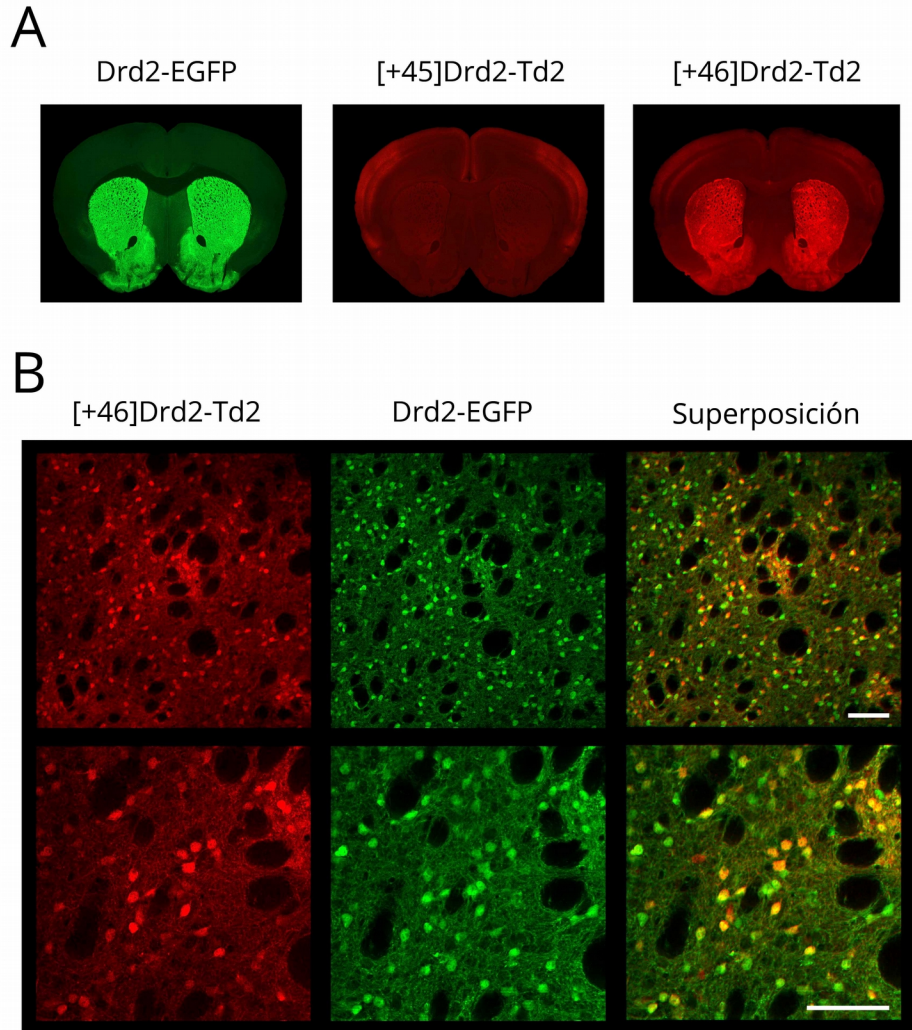


Figura 42. El transgén [+46]*Drd2*-Td2 dirige la expresión al estriado. Inmunofluorescencia contra Td2 (Rojo) y EGFP (Verde). **A.** Imágenes epifluorescentes a bajo poder de cortes coronales a la altura del estriado comparando la expresión de los transgenes. **B.** Imágenes confocales de núcleo estriado de ratones transgénicos para [+46]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP. Escala 100 μ m.

La distribución y los niveles de expresión estriatales producidos por [+46]*Drd2*-Td2 parecen ser más heterogéneos que los observados en ratones *Drd2*-EGFP (Figura 43). En las regiones laterales se puede ver más claramente este fenómeno en donde la expresión de Td2 disminuye progresivamente en contraste con la de EGFP, cuya marcación se encuentra distribuida de manera homogénea (Figura 43, Est). También observamos que los niveles de expresión del reportero rojo son mayores en los parches estriatales en relación a los de la matriz. La

expresión heterogénea también fue observada en otras líneas generadas con distintos transgenes que dirigen al estriado (Figura suplementaria 7), indicando que podría deberse a un efecto posicional o a la ausencia de algún otro elemento regulatorio que complemente, junto a los *enhancers* estudiados, el patrón completo de expresión en esta región. Otras de las áreas de expresión de [+46]*Drd2*-Td2 es el estriado ventral. En el núcleo *accumbens* la expresión de Td2 es abundante y coincide con EGFP (Figura 43, Acc). En el tubérculo olfatorio Td2 coexpresa con EGFP, aunque el número de neuronas marcadas con Td2 es inferior al de las que expresan EGFP (Figura 43, TO).

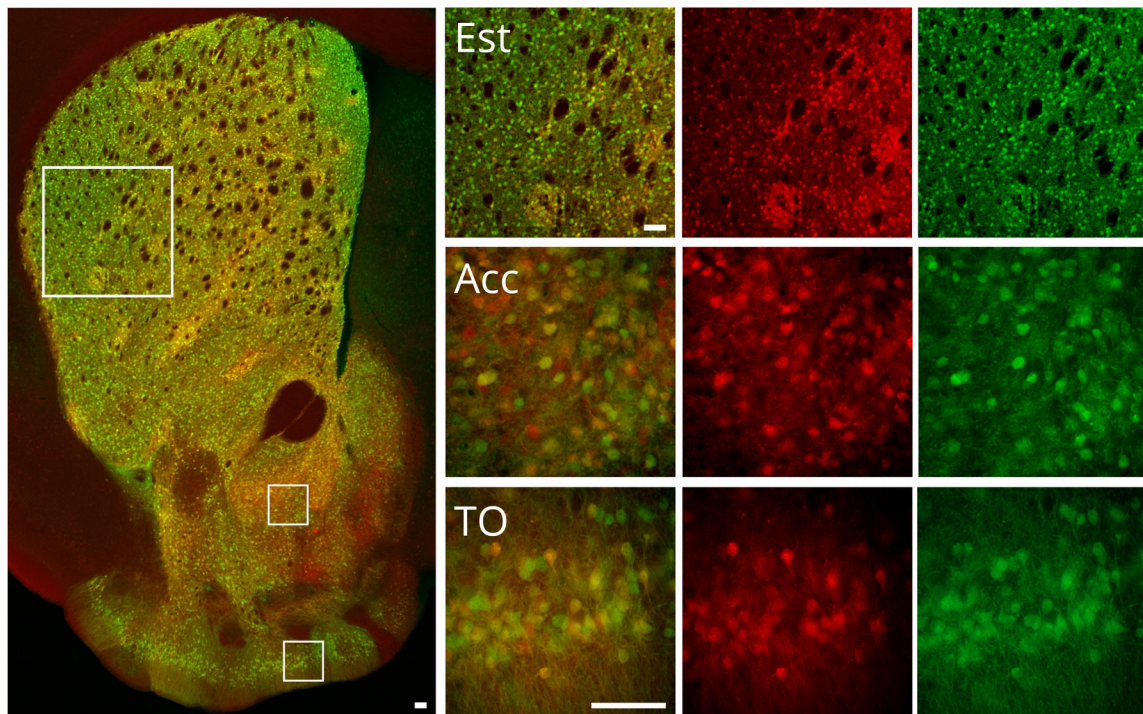


Figura 43. Coexpresión de Td2 y EGFP en el estriado de ratones transgénicos [+46]*Drd2*-Td2 y *Drd2*-EGFP. Inmunofluorescencia contra Td2 (Rojo) y EGFP (Verde) en cortes coronales mostrando la región estriatal. En la región lateral del núcleo la expresión de Td2 disminuye gradualmente, pero se concentra en parches (Est). Las ampliaciones del núcleo *accumbens* (Acc) y el tubérculo olfatorio (TO) muestran colocalización celular entre las proteínas reporteras. Escala 100 μ m.

Para investigar si las neuronas estriatales que expresan Td2 en ratones [+46]*Drd2*-Td2 son sólo GABAérgicas o también incluyen interneuronas colinérgicas realizamos una inmunomarcación contra ChAT en cortes sagitales de cerebro. Mediante microscopía confocal observamos la ausencia de expresión de Td2 en neuronas ChAT positivas (Figura 44), sugiriendo que el control transcripcional de *Drd2* en las interneuronas estriatales colinérgicas se encuentra manejado por otra región genómica que, como se mencionó antes, podría estar localizada en la región de 5 kb río arriba del primer intrón.

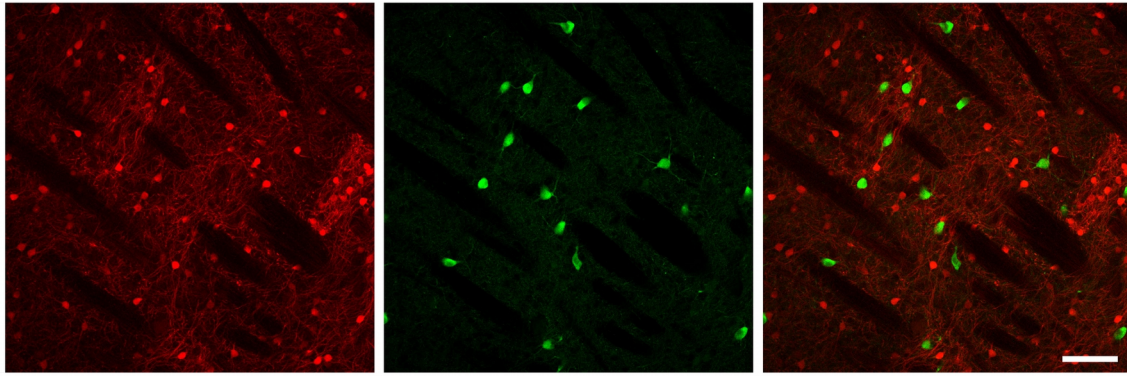


Figura 44. El elemento +46 no dirige la expresión de Td2 en neuronas colinérgicas estriatales. Inmunofluorescencia contra Td2 (Rojo) y ChAT (Verde) en cortes sagitales estriatales de ratones [+46]*Drd2*-Td2. En la superposición de las imágenes confocales puede observarse la ausencia de colocalización de los reporteros (Derecha). Escala 100 μ m.

Además de las regiones del cerebro medio que domina el transgén [+45]*Drd2*-Td2, también encontramos marca de Td2 en el núcleo arcuato del hipotálamo, y, aunque el número es menor que el observado para *Drd2*-EGFP, las imágenes confocales revelaron que las células que expresan Td2 también son positivas para el reportero verde (Figura 45).

La expresión hipofisaria en el lóbulo anterior de los dos transgenes resultó muy variable entre las líneas. Sólo una línea [+45]*Drd2*-Td2 y otra [+46]*Drd2*-Td2 mostraron niveles altos de expresión del reportero (Figura suplementaria 6). En cambio, en el lóbulo intermedio ninguna de las líneas producidas mostró expresión de Td2, sugiriendo que la capacidad de la región +46/+50 de dirigir la expresión a los melanotropos no se debe a la presencia de los elementos conservado +45 y +46.

Los territorios de expresión del transgén [+45]*Drd2*-Td2 en el cerebro medio y el núcleo arcuato hipotalámico son similares entre las 3 líneas generadas, mientras que solo una también posee baja expresión de Td2 en células estriatales (Figura suplementaria 4). En cambio, los territorios del transgén [+46]*Drd2*-Td2 se centran el estriado dorsal y ventral, observándose marca de Td2 en 3 de la 4 líneas, de las cuales una también mostró expresión del reportero en el cerebro medio (Figura suplementaria 5).

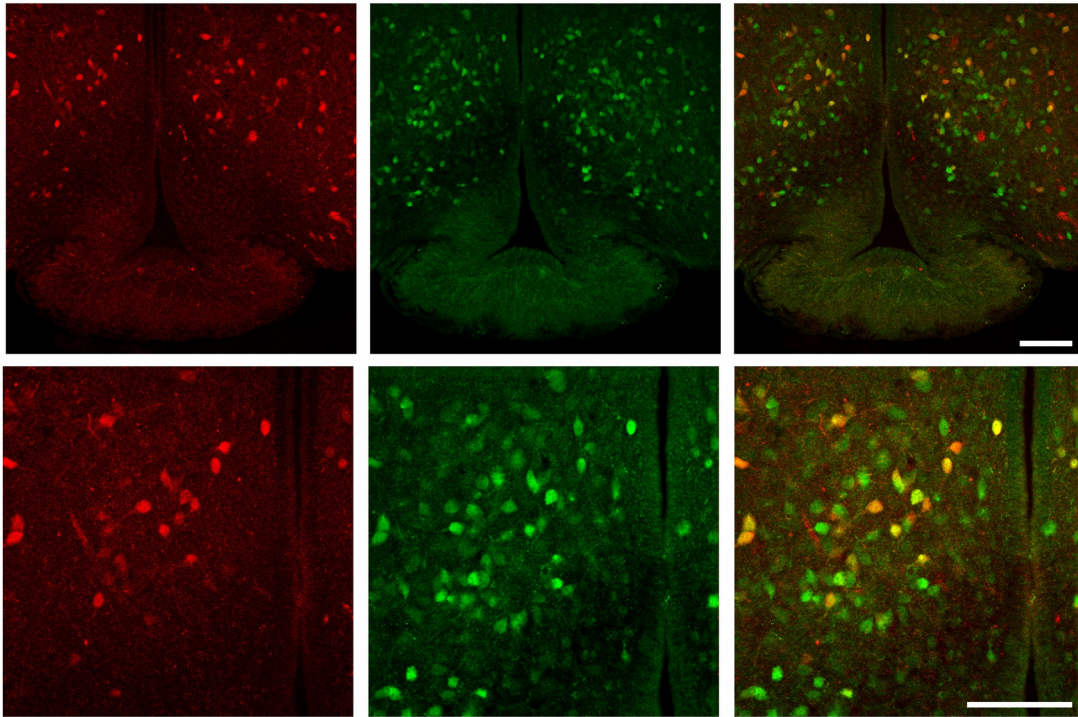


Figura 45. Coexpresión de Td2 y EGFP en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratones [+45]*Drd2*-Td2.*Drd2*-EGFP. Inmunofluorescencia contra Td2 (Rojo) y EGFP (Verde) de un corte coronal de cerebro. Se muestra la colocalización de los reporteros en la imagen superpuesta (Derecha). Escala 100 μ m.

En conjunto, estos resultados nos permiten inferir que el elemento +45 domina territorios, principalmente, en áreas dopaminérgicas y estaría implicado en la expresión de *Drd2* en neuronas donde funciona como autorreceptor mientras que el elemento ubicado en +46 predomina en neuronas postsinápticas GABAérgicas estriatales del circuito indirecto. Sin embargo, no es posible descartar la posibilidad de que ambos elementos funcionen de manera complementaria en ambas regiones con diferente fuerza transcripcional. Como los territorios de expresión de la proteína reportera en ratones [+45]*Drd2*-Td2 parecen coincidir con las áreas dopaminérgicas, realizamos una inmunomarcación fluorescente contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH) para visualizar la colocalización con el reportero (Figura suplementaria 8). La expresión de Td2 en el cerebro medio coincide con la de TH (SNc, VTA, campo retrorubral y rafe dorsal). Sin embargo, en el núcleo arcuato no observamos neuronas que expresen ambos reporteros (Figura suplementaria 8).

7. Posibles FTs implicados en los ensayos de actividad de *enhancers*

Si bien en la actualidad existe una gran cantidad de herramientas bioinformáticas que permiten predecir los sitios de unión y la afinidad relativa de un determinado FT a una secuencia de ADN,

el alto grado de degeneración que admite este tipo de uniones hace que el listado de posibles candidatos esté plagado de falsos positivos y negativos (Wasserman y Sandelin, 2004). Para demostrar que una potencial unión realmente existe es importante realizar experimentos funcionales que permitan evidenciar la interacción física entre una secuencia y un FT, demostrar que el FT se coexpresa con su gen blanco en el tipo celular de interés y que la ausencia del FT perturba su expresión.

Para disminuir la cantidad de falsos positivos combinamos la predicción de sitios de unión de FTs del programa *UniPROBE* (Hume *et al.*, 2015) con alineamientos múltiples de los elementos conservados -2, +4,5, +45 y +46, y la región promotora proximal (ver Materiales y Métodos). A continuación discutiremos en detalle el análisis realizado con el elemento +46 y las dificultades encontradas.

Al alinear las secuencias del elemento +46 correspondientes a diferentes especies encontramos que una secuencia de 38 pb presenta un porcentaje muy alto de identidad entre mamíferos, aves y reptiles, mostrando diferencias en solo 3 bases. Al utilizar la base de datos de *UniPROBE* en una región de 182 pb del genoma de ratón que contiene el elemento conservado +46, con los parámetros por defecto con una línea de corte del puntaje de 0,45 obtuvimos 818 sitios de unión posibles (el puntaje de la predicción varía de -0,5 a +0,5 dependiendo del ajuste del modelo de unión de cada FT a la secuencia). Más de la mitad de estos sitios corresponden a las 9 pb -TTAATTAAT- altamente conservadas entre especies (marcadas en verde en la Figura 46). Al analizar los sitios de unión posibles que solamente comprendieran estas 9 pb encontramos 87 FTs de homeodominio con un puntaje mayor a 0,49. Este análisis indica que más de la mitad de los FTs de homeodominio de mamíferos hallados en *UniPROBE* (171 en total) podría unirse con alta afinidad a secuencias del elemento +46, un resultado incompatible con un escenario real y que asemeja esta búsqueda a la de una aguja en un pajar. Muchos de estos FTs se expresan en varias zonas del cerebro incluyendo el estriado de ratones adultos, pero solo algunos lo hacen específicamente en el estriado. La complejidad de estos resultados demuestra la dificultad de determinar FTs candidatos a partir de los motivos de unión a una secuencia de ADN.

Restringimos la lista de candidatos seleccionando aquellos FTs involucrados en la diferenciación y/o mantenimiento del fenotipo en los diferentes tipos celulares en donde los *enhancers* dirigen la expresión. Posteriormente analizamos la presencia de sitios de unión putativos para estos FTs en la secuencia del elemento conservado utilizando la base de datos *UniPROBE* con un punto de corte de 0,45. En el caso del elemento +46 dos tipos de FTs de

homeodominio parecen ser los mejores candidatos para unirse a su secuencia, los de la familia DLX (*distal-less homeobox*) y los FTs de homeodominio MEIS (Figura 46). Los FTs producidos por los genes *Dlx* se encuentran implicados en el desarrollo y la diferenciación de las neuronas GABAérgicas estriatales y septales. La delección de *Dlx1* y 2 genera la pérdida de expresión de genes típicos de las MSNs, como *Drd2*, *Drd1* y *Penk*, y la disminución en la expresión de la glutamato descarboxilasa en embriones de ratones de 15,5 días (Long *et al.*, 2009). En estos ratones la expresión estriatal de *Dlx5* y 6 se pierde completamente y la de *Meis1* y 2 se ve severamente disminuida. Debido a que el elemento +46 contiene un sitio de unión para la familia DLX y otros dos para MEIS1 y 2 (uno más débil marcado en amarillo claro en la Figura 46), es posible que la expresión estriatal producida en ratones adultos por el *enhancer* +46 se encuentre mediada por estos FTs de homeodominio. A partir de esta información, y porque también se expresan en el estriado de ratones adultos de manera específica (Figura suplementaria 9), consideramos que los mejores FTs candidatos son DLX-6 y MEIS2

Analizamos con los mismos criterios el elemento conservado -2 y el promotor proximal, regiones candidatas para controlar la transcripción de *Drd2* en las neuronas colinérgicas y en los melanotrofos. Estos elementos se encuentran contenidos en el fragmento -5/0 de *Drd2*. Algunos de los FTs conocidos más importantes en el control de la expresión en la hipófisis son producidos por los genes *Pou1F1*, *Prop1*, *Pitx1* y 2, *Lhx3* y 4 (Quentien *et al.*, 2006). En cambio, se sabe que las neuronas colinérgicas estriatales diferenciadas expresan *Nkx2.1*, *Lhx7* e *Isl1* (Capetian *et al.*, 2014; Fragkouli *et al.*, 2009). Como promotor proximal definimos una región de 500 pb conservada que incluye el primer exón. Este promotor proximal posee un alto contenido de bases GC (77%) en coincidencia con la determinación que aproximadamente el 70% de los promotores de vertebrados están enriquecidos en GC (Deaton y Bird, 2011). Al analizar el promotor en la base de datos de *UniPROBE* no se observó que estos FTs tuvieran sitios de unión probable con puntaje mayor a 0,45. Este resultado es coherente con el hecho de que los FTs analizados son del tipo homeodominio y en general tienen una secuencia consenso TAAT, disminuyendo las posibilidades de que se unan a un promotor rico en GC. Por otro lado el elemento conservado -2 presenta una región conservada entre mamíferos placentarios y no placentarios en la que encontramos un único sitio al que podrían unirse FTs como POU1F1, PROP1, LHX7 y ISL1, pero no FTs como NKX2.1 o PITX1 y 2 (Figura 46, elemento -2).

En la región de *Drd2* 0/+10 deberían encontrarse los *enhancers* que dirigen la expresión al *septum* y la mPFC. Como comentamos en el punto 4, el mejor candidato para esta actividad es el elemento conservado +4,5. En cuanto a la identidad de los tipos celulares se sabe que más del 90% de las neuronas septales son GABAérgicas (Zhao *et al.*, 2013) y que la familia de FTs

Dlx es esencial en la diferenciación de este tipo neuronal (Long *et al.*, 2009). Por estas razones algunos de los mejores candidatos para el control de la transcripción son los FTs DLX6 que se expresan en el *septum* lateral tanto en embriones como en adultos (Figura suplementaria 9). Por otro lado, el control de la expresión en la mPFC depende de una interacción múltiple entre FTs con diferentes gradientes de expresión a lo largo de la corteza cerebral, como los observados para NKX2.1 y PAX6 (Schubert *et al.*, 2014). Al analizar los motivos de FTs en el elemento +4,5 encontramos dos sitios de unión posibles para PAX7 (que tienen un motivo de unión similar al de PAX6) y miembros de las familias de FTs DLX conservados entre mamíferos (Figura 46, elemento +4,5). Además de los sitios que podrían unir PAX6, también existe un sitio de unión putativo para NKX2.1 conservado entre mamíferos, lo que sugiere la existencia de 3 posibles sitios de unión a FTs para el control de la transcripción en la mPFC.

Por último, analizamos el elemento conservado +45 que actúa como *enhancer* en las áreas dopaminérgicas del cerebro medio. Los TFs más estudiados en la diferenciación de estas neuronas son los producidos por los genes *Pitx3*, *Nurr1*, *En1* y *En2* (Jacobs *et al.*, 2011; Smidt y Burbach, 2007; Smits *et al.*, 2003; Veenvliet *et al.*, 2013), pero también en el desarrollo de la región son importantes los TFs producidos por *Lmx1a*, *Lmx1b* y *Phox2a* (Deng *et al.*, 2011; Smidt y Burbach, 2007). Al analizar la secuencia de ratón de 181 pb que contiene este elemento conservado encontramos varios sitios de unión conservados entre mamíferos a los que estos FTs se pueden unir. Los FTs de homeodominio de interés LMX1A y B, PHOX2A, EN1 y 2 poseen un sitio de unión putativo en común (Figura 46, elemento +45, secuencia marcada en verde). PITX3 tiene un sitio de unión posible separado, y a pesar de que la secuencia consenso TAAT no se encuentra, el puntaje determinado por *UniPROBE* es mayor a 0,45. Por otro lado, NURR1 es un FT de la familia de receptores de hormonas nucleares (RNs), su motivo de unión no se encuentra en la base de datos, pero el análisis de la secuencia en *UniPROBE* mostró que hay un sitio putativo conservado para la unión de otros RNs. Sin embargo, el motivo de unión de NURR1 sí se encuentra en la base de datos JASPAR (Mathelier *et al.*, 2014) siendo la secuencia más representativa -AGGTCA- que coincide con el sitio de unión determinado por *UniPROBE* para RNs (Figura 46, marcado en azul oscuro). También pudimos observar un sitio de unión putativo similar pero conteniendo una base diferente (Figura 46, marcado en azul claro). A partir de estos datos consideramos que los FTs que podrían estar controlando la expresión en las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio de ratones adultos a través del *enhancer* +45 son PITX3, NURR1, EN1 y 2.

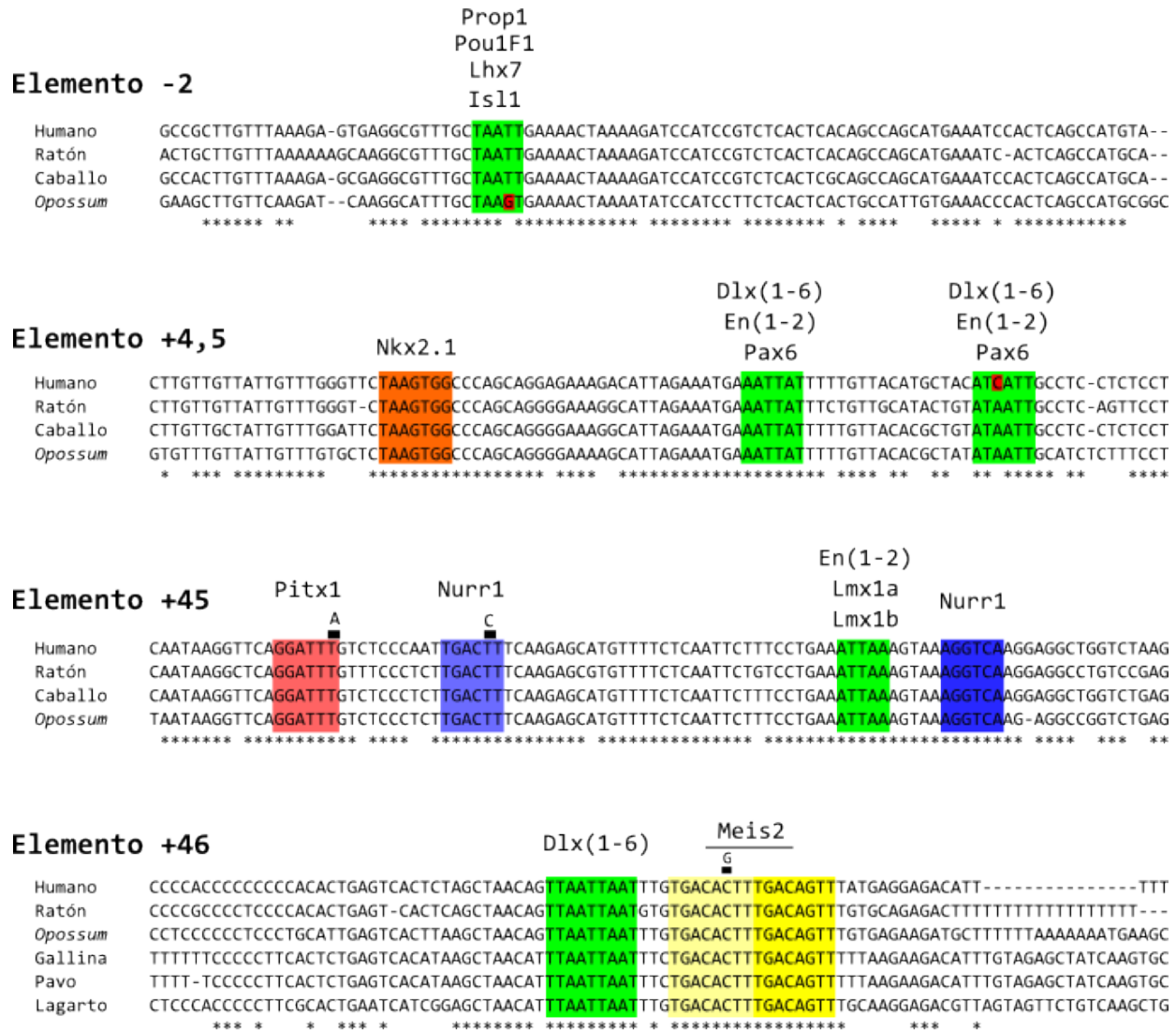


Figura 46. Posibles sitios de unión de FTs en las regiones más conservadas de los enhancers de *Drd2* identificados y estudiados en esta Tesis. Las secuencias coloreadas corresponden a los posibles sitios de unión de los FTs indicados. En los elementos -2 y +4,5 se indican en rojo las bases que no alinean con las demás secuencias. En los elementos +45 y +46 se indica con una línea las bases que mejorarían la correlación con el motivo de unión. Las predicciones se realizaron usando *UniPROBE* sobre las secuencias de los elementos correspondientes al genoma de ratón, y las secuencias se alinearon utilizando *ClustalW*. Se muestran las 100 pb mejores alineadas que presentaron sitios de unión con FTs de interés.

8. Uso de los nuevos enhancers de *Drd2* para el direccionamiento de vectores lentivirales en el cerebro de ratón

El descubrimiento del enhancer de *Drd2* estriatal +46 nos motivó a utilizarlo como una herramienta novedosa de posible interés en neurociencia molecular y funcional. En particular, nos propusimos examinar su capacidad para dirigir la expresión de proteínas heterólogas a circuitos neurales que integran estas neuronas pero no a otras que también expresan *Drd2* usando otros enhancers específicos. Los vectores lentivirales son de gran utilidad porque

permiten introducir ADN foráneo que se integra en el genoma de células no mitóticas y permite la expresión de genes exógenos incluidos en el ADN integrado (Naldini *et al.*, 1996). La inyección de vectores lentivirales en zonas específicas del cerebro de ratones adultos es una metodología muy utilizada para activar o desactivar genes en regiones y/o tipos celulares específicos.

Para probar la capacidad del *enhancer* +46 de dirigir la expresión de genes en neuronas estriatales de la vía indirecta generamos dos tipos de construcciones lentivirales uno que contiene la secuencia codificante para la recombinasa CRE (46-CRE) y otro que codifica para la secuencia de EGFP (46-EGFP). En ambos vectores usamos el promotor mínimo de la TK del virus *Herpes simplex*, al igual que en transgenes anteriores (Figura 47). En colaboración con la Dra. Elena Avale del INGEBI diseñamos, construimos y producimos los vectores lentivirales conteniendo el *enhancer* estriatal de *Drd2*. Para la producción de las partículas virales se transfectaron 3 plásmidos en células HEK-293T, uno que codifica para las proteínas de envoltura y otro para las proteínas de empaquetamiento junto con el vector lentiviral de interés. Luego de dos días se cosecharon las partículas virales y se concentraron mediante ultracentrifugación a 100.000 g permitiéndonos la obtención de títulos virales aproximados a 1×10^7 unidades transductivas por ml.

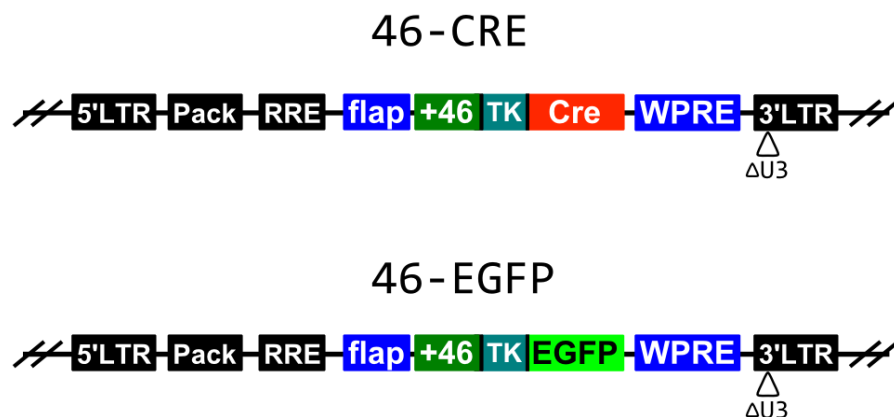


Figura 47. Esquemas de los vectores lentivirales 46-CRE y 46-EGFP. El *enhancer* estriatal +46 seguido del promotor TK se encuentran río arriba de la secuencia codificante *Cre* en el vector 46-CRE y río arriba de EGFP en el vector 46-EGFP. El vector contiene secuencias adicionales necesarias para el empaquetamiento (Pack: señal de empaquetamiento de ARN; RRE: elemento de respuesta *rev*), la integración (LTR: repetición terminal larga), secuencias que aumentan la infectividad (flap) y la estabilidad del mensajero (WPRE: elemento regulatorio post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota). ΔU3: delección de la porción U3.

Para probar la actividad de la recombinasa CRE dirigida por el vector 46-CRE, inyectamos 1,5 μ L de la preparación viral pura en el cerebro de ratones de la cepa reportera Ai14, que tienen la

particularidad de expresar la proteína fluorescente roja tdTomato en los tejidos donde se presenta CRE. Realizamos las inyecciones estereotáticas del lentivirus +46-CRE en dos sitios diferentes del cerebro de un mismo ratón Ai14, una en el cuerpo estriado para evaluar la expresión en el tejido que domina el *enhancer* +46, y otra a la altura del cerebro medio para comprobar la especificidad del vector lentiviral (coordinadas en Materiales y Métodos). En los ratones Ai14, la transcripción de tdTomato se halla bloqueada por sitios de terminación de la transcripción flanqueados de dos sitios *loxP* que pueden ser eliminados en presencia de CRE permitiendo la expresión de tdTomato bajo el control del promotor ubicuo CAG (Madisen *et al.*, 2010). El sistema Cre-Lox es una herramienta molecular muy utilizada que permite realizar recombinaciones *in vivo* específicas entre secuencias *loxP* insertadas por ingeniería genética. Se lo utiliza comúnmente para generar deleciones o inversiones en un fragmento genómico y mediante este rearrreglo del ADN suprimir o activar la expresión de un gen (Nagy, 2000).

En la Figura 48 se observan imágenes de epifluorescencia de un corte coronal a la altura del estriado y de otro a la altura del cerebro medio cercanos al sitio de inyección. Observamos expresión de la proteína tdTomato en el estriado en las cercanías del sitio de inyección (Figura 48 A y B), pero también en la corteza cerebral inmediata al cuerpo calloso y en la región septal (Figura 48 C y D, respectivamente). Por otro lado, en el sitio de inyección a la altura del cerebro medio también observamos una intensa expresión de tdTomato (Figura 48 E y F), con un patrón que sugiere que gran parte de la marca fluorescente se debe a la glía infectada con el lentivirus.

A diferencia de la transcripción de tdTomato activada por CRE, en el vector 46-EGFP la expresión de la proteína reportera está bajo el control del *enhancer* +46 y el promotor mínimo de TK. Esta estrategia metodológica permitiría estudiar efectos cuali y cuantitativos producidos por mutaciones en este *enhancer* siguiendo la expresión de EGFP en ratones *wild type*.

Como en el ensayo anterior, se realizaron dos inyecciones estereotáticas en ratones C57BL6/J de las partículas virales conteniendo el vector 46-EGFP a nivel del estriado y del cerebro medio. En la Figura 49 se observan imágenes de epifluorescencia de cortes coronales cercanos a las áreas de inyección. La expresión de EGFP en el estriado se encuentra restringida al sitio de inyección (Figura 49 A y B), aunque también pudimos observar expresión en una zona de la corteza por donde pasó la aguja de inyección (Figura 49 B). El lentivirus 46-EGFP en el cerebro medio también produjo expresión en las células cercanas al sitio de inyección (Figura 49 D y E). Por otro lado, las células marcadas en el estriado y en cerebro medio tienen mayormente morfología neuronal sugiriendo una menor actividad del vector en glía (Figura 49 C y F, respectivamente).

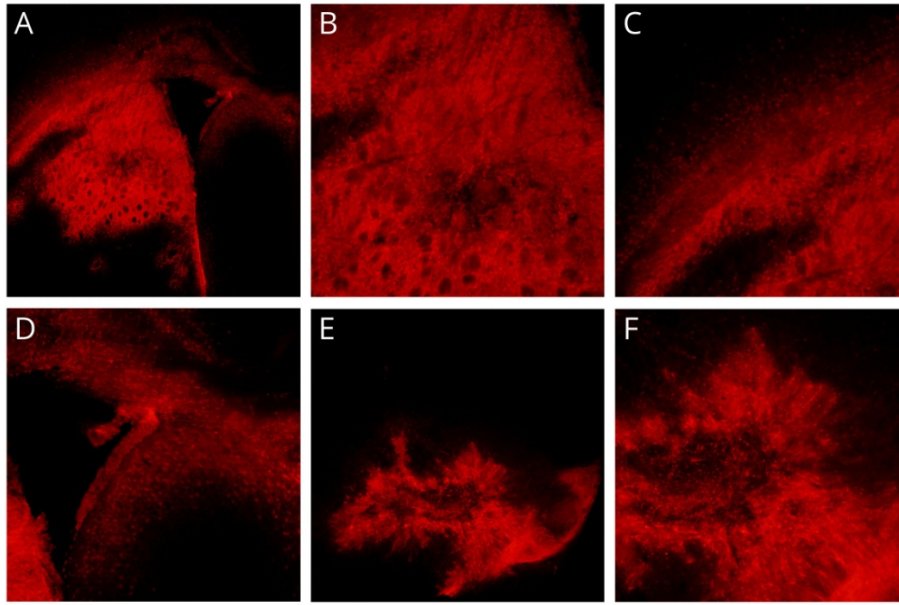


Figura 48. Expresión de tdTomato inducida por el lentivirus 46-CRE en ratones Ai14. Imágenes epifluorescentes de cortes coronales cercanos al sitio de inyección estriatal (A-D) y del cerebro medio (E-F). Se observa expresión de la proteína reportera en el sitio de inyección estriatal (A y su ampliación B), y regiones corticales y septales (C y D respectivamente). En la región del cerebro medio inyectada también se observa expresión de tdTomato (E y su ampliación F)

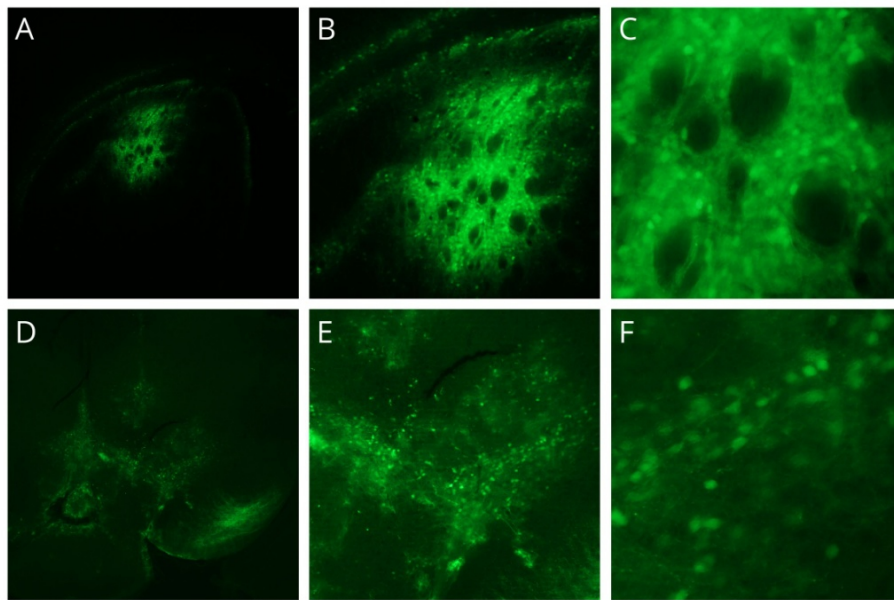


Figura 49. Expresión producida por el lentivirus 46-EGFP. Imágenes epifluorescentes de cortes coronales cercanos al sitio de inyección estriatal (A-C) y del cerebro medio (D-F). Se observa expresión de EGFP en el sitio de inyección estriatal (A, y sus ampliación B y C). En la región del cerebro medio inyectada también se observa expresión de EGFP (D, y sus ampliaciones E y F)

Los resultados obtenidos con estos lentivirus muestran que, al menos en estas condiciones experimentales, no es posible dirigir la expresión de Cre o EGFP de manera específica a neuronas transactivables selectivamente por el *enhancer* +46. Existen reportes que sugieren

actividad ectópica en lentivirus expresados a partir de *enhancers* específicos (Ikawa *et al.*, 2003; Jakobsson *et al.*, 2004). En el trabajo realizado por Jakobsson *et al.* (2004) se observa que los vectores lentivirales conteniendo GFP bajo el promotor específico de la proteína ácida fibrilar glial (GAFP), presentan una mayor expresión inespecífica en el tejido cuando el título viral es elevado. De esta manera, consideramos que para verificar la utilidad de los vectores lentivirales en ensayos de expresión guiada por *enhancers*, es necesario evaluar si existe un título viral que permita una actividad transcripcional apreciable y a su vez específica. Próximamente realizaremos una serie de experimentos con una serie de diluciones del virus para investigar si alcanzamos el objetivo deseado.

CONCLUSIONES

En esta Tesis Doctoral logramos realizar una disección molecular y funcional del mapa transcripcional del gen que codifica al receptor de dopamina D2 de ratón (*Drd2*) a través del análisis de expresión en ratones transgénicos de una gran variedad de secuencias conservadas distribuidas a lo largo del *locus*. Si bien la confección de este mapa aún no es completa ni definitiva, constituye una primera aproximación que permitió, por un lado consolidar la prueba conceptual de que es posible desentrañar este tipo de mapas topotranscripcionales y por el otro nos ha permitido identificar varios *enhancers* transcripcionales de *Drd2* y sus territorios de expresión en cerebro e hipófisis. La generación de ratones deficientes en alguno de estos *enhancers* podrá dar respuestas definitivas acerca de su importancia funcional relativa en la transcripción de *Drd2* en los distintos tipos celulares. Los resultados principales obtenidos en esta Tesis y su significancia son:

Utilizando ratones transgénicos portadores de BACs generados a partir de delecciones del BAC *Drd2*-EGFP demostramos que un fragmento de 60 kb compuesto por 5 kb de la región 5' flanqueante, el promotor, el primer exón, el primer intrón y el segundo exón tienen la capacidad de dirigir la expresión de la proteína reportera Td2 a una variedad de regiones donde normalmente se expresa *Drd2* y que incluyen el estriado, el cerebro medio, el *septum*, la mPFC, el núcleo arcuato del hipotálamo, el núcleo olivar pretectal y la hipófisis.

Dentro de esta región, las 5 kb río arriba del TSS parecen dirigir la expresión de *Drd2* en interneuronas colinérgicas estriatales (Figura 50), siendo el elemento conservado -2 el mejor candidato a funcionar como *enhancer* específico de este tipo celular por sus sitios de unión putativos a los FTs ISL1 y LHX7. No obstante, son necesarios más análisis de disección genética ya que las líneas transgénicas generadas con esta región mostraron resultados muy variables.

La región de 10 kb río abajo del TSS controla, en cambio, la expresión en la mPFC, el *septum* y el cerebro medio (Figura 50). El elemento conservado +4,5 es el mejor candidato para cumplir algunas de estas funciones. La predicción de sitios de unión para FTs sugieren que PAX6 y NKX2.1 podrían controlar la expresión de *Drd2* en la mPFC, miembros de la familia DLX podrían controlar la transcripción septal y EN1 y EN2 podrían controlar la expresión de *Drd2* en el cerebro medio.

El elemento conservado +45 funciona como *enhancer* transcripcional dirigiendo la expresión de Td2 en las áreas dopaminérgicas del cerebro medio y del núcleo arcuato del hipotálamo (Figura

50). Esta actividad podría estar controlada por los FTs EN1 y 2, NURR1 y PITX3 que tienen sitios de unión putativos a la secuencia del elemento.

El elemento conservado +46 tiene la capacidad de dirigir altos niveles de expresión de gen reportero en neuronas espinosas medianas GABAérgicas del circuito extrapiramidal indirecto de los ganglios de la base, tanto en el estriado dorsal como en el estriado ventral (núcleo *accumbens*) y el tubérculo olfatorio (Figura 50). Incluye una secuencia de 38 pb de elevada identidad entre mamíferos, aves y reptiles, que tiene posibles sitios de unión para una variedad de FTs con homeodominio, que particularmente incluyen a miembros de la familia DLX y MEIS.

En la hipófisis solo observamos expresión consistente con los patrones de *Drd2* en el lóbulo intermedio en las líneas de ratones con transgenes portadores de las regiones -5/+0 y +43/+50. El elemento conservado -2 tiene un sitio de unión a FTs hipofisarios como POU1F1 y PROP1. Los elementos +45 y +46, en cambio, no parecen tener capacidad para dirigir la expresión en melanotropos, lo que los excluye como posibles responsables de la expresión producida por la región +43/+50.

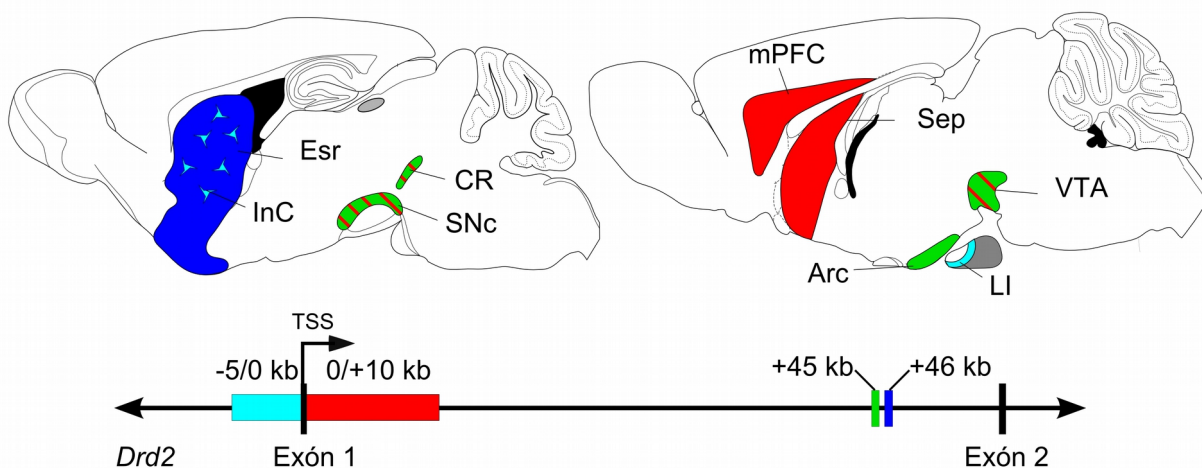


Figura 50. Fragmentos genómicos estudiados y su actividad transcripcional en cerebro e hipófisis de ratones transgénicos. La región -5/+0 (celeste) dirige la expresión a interneuronas colinérgicas (InC) y melanotropos del lóbulo intermedio (LI); la región -0/+10 (roja) a la mPFC, el *septum* (Sep) y en menor medida al cerero medio (SNc, CR y VTA); el *enhancer* +45 principalmente a áreas dopaminérgicas SNc, CR, VTA y núcleo arcuato del hipotálamo (Arc) y el *enhancer* +46 al estriado dorsal y ventral (Est). Algunos de estos tejidos sólo mostraron patrones de expresión compatibles con los de *Drd2* en los ensayos con BACs, como el OP y la hipófisis anterior (marcados en gris).

En el núcleo olivar pretectal y en la hipófisis anterior solo observamos resultados consistentes con los patrones de expresión de *Drd2* en ratones transgénicos producidos con los BACs que incluyen la región -5/+55, resultados que sugieren que los *enhancers* que dirigen la expresión a estas áreas están localizados en regiones del primer intrón no analizadas en este trabajo.

Como resumen final, en esta Tesis estudiamos las regiones en *cis* de *Drd2*, logrando por primera vez un avance significativo en la comprensión de su regulación transcripcional. La continuación de este trabajo permitirá identificar los sitios claves y los FTs responsables de la regulación transcripcional de *Drd2* en el cerebro medio y en el estriado producida por los *enhancers* +45 y +46, respectivamente. Por otro lado, los resultados obtenidos facilitarán la futura identificación de los *enhancers* que controlan la expresión de *Drd2* en el *septum*, la mPFC y el lóbulo hipofisario intermedio. La delección individual o colectiva de los *enhancers* del locus de *Drd2* de ratón mediante el uso de la técnica de edición del genoma CRISPR/Cas9 permitirá comprender más en detalle el papel que desempeñan en la regulación de la expresión de *Drd2* en su entorno génico real.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales y Bioterio

Los ratones se alojaron en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET) usando un sistema de ventilación permanente de jaulas independientes, que inyecta aire filtrado al interior de cada jaula y lo extrae al exterior de la sala con presiones de inyección y extracción controladas (Thoren Caging Systems, Inc. Hazleton, PA-USA). Se mantuvieron bajo condiciones controladas de ciclo luz/oscuridad de 12 h (7:00 a 19:00 h) y una temperatura ambiente entre 20 y 22 °C. Los ratones recibieron una dieta comercial de mantenimiento. Todos los ratones fueron tratados respetando los principios de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” publicada por el Servicio Público de Salud de los Estados Unidos.

2. Genotipificación de ratones

Preparación de ADN para genotipificación

Las muestras de ADN para genotipificar ratones se prepararon a partir de tejido de oreja obtenido con sacabocados, que de manera simultánea también sirvió para la identificación visual de los ratones. Se digirieron las muestras en 100 µl de *buffer* de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8,8; EDTA 1 mM, Tween-20 0.5%) conteniendo 0,8 mg de proteinasa K (Invitrogen, USA) a 55 °C durante toda la noche (O/N). Finalmente se disgregó el tejido agitando las muestras en *buffer* vigorosamente y se inactivó la proteinasa K a 99 °C durante 15 min.

Genotipificación de ratones mediante PCR

Para las reacciones de PCR se utilizó 1 µl de las muestras de ADN en un volumen final de 20 µl. El producto de reacción se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TBE (Tris-bórico 45 mM pH 8,3, EDTA 1 mM), conteniendo 0.4 µg/ml de bromuro de etidio para visualización del producto con luz UV.

PCR para la detección de Tdimer2 (Td2): *Primers* 5'-AGG ACG GCA CGC TGA TCT AC-3' (Td1) y 5'-ACC TTG AAG CGC ATG AAC TCC-3' (Td2). Producto final de 400 pb. *Buffer* mezcla: Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, dNTP 0,2 mM, *Primers* 0,6 µM (cada uno), 2 unidades de Taq en 20 µl final. Condiciones de ciclado: 94 °C durante 5 min; 6 ciclos de

94 °C 30 seg, 67 °C 30 seg decreciendo 0,5 °C por ciclo, 72 °C 30 seg; 26 ciclos de 94 °C 30 seg , 64 °C 30 seg , 72 °C 30 seg; 72 °C 5 min.

PCR para la detección de EGFP: *Primers* 5'-GTG TTC TGC TGG TAG TGG T-3' y 5'-ATC GAC TTC AAG GAG GAC G-3'. Producto final de 176 pb. *Buffer* mezcla: Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 3mM, dNTP 0,2 mM, *Primers* 0,4 µM (cada uno), 2 unidades de Taq en 20 µl final. Condiciones de ciclado: 95°C durante 8 min; 30 ciclos de 95°C 30 seg, 60°C 30 seg, 72°C 30 seg; 72°C 5 min.

3. Producción de ratones transgénicos

Preparación de los transgenes para la microinyección pronuclear

Los transgenes a microinyectar se obtuvieron a partir de digestiones de ADN plasmídico (*HiSpeed Plasmid Midi Kit*-Qiagen, Alemania). Con el fin de eliminar la secuencia del vector se digirieron los plásmidos con NotI y/o Sall, dependiendo de la construcción, se resolvieron en gel de agarosa y los fragmentos deseados se purificaron utilizando las columnas de intercambio iónico Elutip-D (Schleicher & Schuell BioScience, USA). Luego se precipitaron los productos de purificación con 10% v/v de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol 100% a – 20 °C por 2 h y posterior centrifugación a 25000 g y a 4 °C durante 20 min, se lavaron dos veces con etanol 70%, y se suspendieron en *buffer* de microinyección (Tris-HCl 5mM, pH 7,4; EDTA 0,1 mM). Finalmente, se llevó a 2 ng/µl de concentración final para microinyectar.

Preparación de los BACs para microinyección pronuclear

Los ADN provenientes de BACs se purificaron utilizando un kit de maxipreparación (*Nucleobond AX*, Machery-Nagel, Alemania). Se linealizaron 2 µg de ADN con PI-SceI en 150 µl de reacción y posteriormente se dializaron O/N (durante la noche) contra *buffer* de microinyección de BACs (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM, NaCl 100 mM). La correcta linealización y el estado de los BACs se revisaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Finalmente, cada preparación se llevó a 2 ng/µl de concentración final para microinyectar.

Obtención de cigotos

Para obtener los cigotos aptos para microinyección se utilizaron hembras FVB/NJ (The Jackson Laboratory, USA) jóvenes, de entre 4 y 5 semanas de edad, a las cuales se les indujo la ovulación. Para esto los ratones recibieron 5 UI de PMS (suero de yegua preñada)

administrados de forma intraperitoneal (i.p.) a las 15:00 h y dos días más tarde recibieron 5 UI i.p. de gonadotrofina coriónica humana (hCG) a las 13:00 h. Luego de la inyección con hCG se alojaron en jaulas individuales con machos FVB/NJ en edad reproductiva. Al día siguiente se sacrificaron mediante dislocación cervical las hembras que presentaron tapón vaginal y posteriormente mediante incisión se expuso la cavidad abdominal para extraer los oviductos conteniendo los cigotos. Los oviductos aislados se lavaron en medio M2 (Sigma-Aldrich, USA) suplementado con penicilina-G potásica 0,06 g/L y sulfato de estreptomicina 0,05 g/L. Se disectaron los oviductos bajo microscopio estereoscópico (Leica, Alemania) utilizando microforceps y agujas de 25G para liberar los cigotos. Para disociar las células del *cumulus* de los cigotos se incubaron en M2 conteniendo 0,1% de hialuronidasa hasta lograr obtener cigotos sin células adosadas (máximo tiempo de incubación 10 min). Posteriormente, se lavaron 5 veces los cigotos en medio M2 y se pasaron a medio M16 (Sigma-Aldrich, USA) suplementado con penicilina-G potásica 0,06 g/L y sulfato de estreptomicina 0,05 g/L. Finalmente, los cigotos se mantuvieron en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta su microinyección.

Microinyección pronuclear

Los ratones transgénicos se generaron mediante microinyección pronuclear de cigotos de FVB/NJ (The Jackson Laboratory, USA). Para la microinyección se utilizaron micropipetas de sujeción y de inyección preparadas a partir de capilares de borosilicato estiradas con un estirador vertical de micropipetas (*Vertical Pipette Puller*, Model 720, KOPF, David Kopf Instruments, USA). Para su empleo se utilizó un micromanipulador manual (Leica, Alemania). Los cigotos se colocaron en una gota de medio M2 recubierta con aceite mineral y se seleccionaron aquellos con dos pronúcleos visibles, observados utilizando una óptica de contraste de interferencia diferencial (FS Labovet, Leica, Alemania). Posteriormente se inmovilizaron los cigotos seleccionados de a uno por vez utilizando la pipeta de sujeción y se inyectó aproximadamente 1 pL de solución conteniendo el transgén (2 ng/μl de ADN en Tris-HCl 5mM, pH 7,4; EDTA 0,1 mM) en el pronúcleo de mayor tamaño. Los cigotos microinyectados se mantuvieron en medio M16 a 37 °C y 5% de CO₂ hasta su transferencia.

Transferencia embrionaria a hembras pseudopreñadas

Para la transferencia de los cigotos se utilizaron hembras en edad reproductiva entre 6 y 9 semanas. Se aparearon con machos vasectomizados la noche anterior al día de microinyección y por la mañana se seleccionaron las hembras con tapón vaginal. Finalizada la microinyección se anestesiaron las hembras pseudopreñadas con avertina (300 mg/kg i.p.) y luego se realizó

una incisión lateral de 1 cm para exponer el oviducto. Para realizar la transferencia se expuso el infundíbulo abriendo la bursa y se transfirieron entre 20 y 25 cigotos en medio M2 por oviducto a través del infundíbulo con una pipeta pasteur de vidrio estirada manualmente con un diámetro interno aproximado de 110 μ m. Finalmente se suturaron las incisiones y se mantuvieron los ratones sobre almohadilla térmica hasta observar signos de recuperación.

Transgenes Microinyectados

- BAC [-65/+55]*Drd2*-Td2: linealizado con PI-SceI
- BAC [-5/+55]*Drd2*-Td2: linealizado con PI-SceI
- [5/0]*Drd2*-Td2: se obtuvo digiriendo pBS-*Drd2*(-5/+0,12)-Td2 con NotI y Sall 8 kb totales
- [-5/+10]*Drd2*-Td2: se obtuvo digiriendo pBS-*Drd2*(-5/+10)-Td2 con NotI y Sall 17.9 kb totales
- [+43/+50]*Drd2*-Td2: se obtuvo digiriendo pZero-*Drd2*(+43/+50)-TK-Pomc-Td2 con NotI 13.8 kb totales
- [+45]*Drd2*-Td2: se obtuvo digiriendo pBS+45-TK-Pomc-Td2 con NotI 6.4 kb totales
- [+46]*Drd2*-Td2: se obtuvo digiriendo pBS+46-TK-Pomc-Td2 con NotI 6.4 kb totales

4. Análisis de expresión

Obtención de los tejidos

Para el análisis de expresión se utilizaron preferentemente ratones descendientes de ratones transgénicos fundadores con más de 4 semanas de edad. Para la extracción del tejido se anestesiaron los ratones con avertina (300 mg/kg i.p.) y se fijaron los tejidos mediante perfusión intracardíaca. Esta metodología consiste en exponer la cavidad torácica del animal para luego inyectar a través de una cánula en el ventrículo izquierdo primero solución fisiológica y luego paraformaldehído (PFA) al 4%, de esta manera las soluciones alcanzan todos los tejidos a través del sistema circulatorio y salen del organismo por una incisión realizada en la aurícula derecha. Posteriormente, se disecaron los cerebros y las hipófisis, se incubaron en PFA al 4% O/N y se mantuvieron en *buffer* fosfato salino (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) hasta la obtención de secciones.

Obtención de secciones de cerebros

Los cortes de cerebros se realizaron utilizando un vibrátomo de seccionamiento (Leica, Alemania). Para esto se pegaron los cerebros a la platina del vibrátomo utilizando un adhesivo a base de metilcianocrilato (La Gotita – Poxipol, Argentina) y los cortes flotantes se recolectaron

en PBS. Para la obtención de secciones sagitales se realizó un corte sagital lateral en los cerebros para generar una base de contacto, necesaria para adherir el cerebro a la platina, y se realizaron cortes de entre 40 y 50 μm . En el caso de las secciones coronales, se realizó un corte coronal en los cerebros para adherir a la platina del vibrátomo y se realizaron secciones de 40 a 50 μm antero-posteriores desde el inicio del estriado hasta el final del cerebro medio. Finalmente las secciones se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio de congelación (30% etilenglicol, 30% glicerol en PBS).

Obtención de secciones de hipófisis

Luego de la fijación, para proteger los tejidos durante el proceso de congelación, las hipófisis se incubaron en solución de sacarosa al 15% en PBS O/N a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguida de una incubación en sacarosa al 30% en PBS O/N a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego, se embebieron las hipófisis en medio de congelación (O.C.T. Tissue-Tek) y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su seccionado. La obtención de las secciones se realizó en un criostato de congelación (Leica 1510S, Alemania). Previo a esto se mantuvieron los tejidos a la temperatura de seccionado de $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h. Se adhirieron las hipófisis en la base de corte del criostato utilizando medio de congelación y se obtuvieron secciones coronales de entre 18 y 20 μm de espesor. Finalmente, se montaron las secciones en portaobjetos positivados (Fisher Scientific, Reino Unido) y se dejaron secar O/N. Se utilizaron inmediatamente o se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia en cortes flotantes

Para la visualización de la expresión de los transgenes se utilizó tanto inmunohistoquímica como inmunofluorescencia. La inmunohistoquímica con 3,3'-Diaminobencidina (DAB) permite un análisis morfológico más detallado, confiere una mayor sensibilidad de detección y permite un almacenaje prolongado para posteriores análisis histológicos. La inmunofluorescencia permite aumentar la señal para una mejor detección de las proteínas reporteras y facilita el análisis colocalización con otras moléculas celulares.

Inmunohistoquímica con DAB: se incubaron las secciones en una solución de H_2O_2 al 1% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Luego, se lavaron las secciones 2 veces en PBS durante 10 min cada vez y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en PBS con suero normal de cabra (NGS, Sigma-Aldrich, USA) al 2% y Tritón X-100 al 0,3% O/N a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, se lavaron los cortes 2 veces durante 10 min en PBS y se incubaron 2 h con el anticuerpo secundario conjugado con biotina en PBS con 0,3% Tritón X-100. Luego, se lavaron

los cortes 2 veces durante 10 min en PBS y se incubaron 1 h con el complejo streptavidina-peroxidasa (ABC Kit, Vectastain, Vector Labs, USA) preparado con 30 min de anticipación. Posteriormente, se lavaron los cortes 2 veces durante 10 min en PBS y se incubaron en una solución con DAB (DAB al 0,025% y H₂O₂ al 0,05% en PBS) hasta una correcta visualización de la tinción deteniendo la reacción con agua corriente. Terminada esta etapa, se montaron los cortes en portaobjetos positivados y se dejaron secar a TA toda la noche. Finalmente, las secciones se deshidrataron incubándolas sucesivamente en soluciones de etanol al 70%, 95%, y 100% durante 3 min por vez, luego se incubaron en xileno durante 3 min, y se cubrieron directamente con medio de montaje (Permout, Fisher Scientific, Reino Unido) y cubreobjetos.

Inmunofluorescencia: Se lavaron las secciones en PBS y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en PBS (ver anticuerpos primarios) conteniendo 2% de suero normal de cabra o burro, según el anticuerpo secundario a emplear, y 0,3% de Tritón X-100 O/N a 4 °C. Al día siguiente, se lavaron los cortes 2 veces durante 10 min en PBS y se incubaron 2 h con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos en PBS con 0,3% Tritón X-100 (ver anticuerpos secundarios). Finalmente, se lavaron las secciones dos veces durante 10 min en PBS, se montaron en portaobjetos positivizados cubriendo con medio de montaje acuoso para inmunofluorescencias (Vectashield, Vector Labs, USA) y cubreobjetos.

Anticuerpos primarios (Diluciones):

- de conejo contra EGFP (1:10000; AbCam, ab290 , Reino Unido)
- de pollo contra EGFP (1:500; Aves Labs, GFP-1020, USA)
- de conejo contra dsRed (1:500; Clontech, 632496, USA)
- de cabra contra ChAT (1:100; CHEMICON, 20120356, USA)
- de cabra contra prolactina (1:200; Santa Cruz Biotechnology, sc-7805, USA)
- de ratón contra TH (1:2000; CALBIOCHEM; 657010)

Anticuerpos secundarios (Diluciones):

- de cabra contra IgG de conejo biotinilado (1:200; Vector Labs BA-1000, USA)
- de burro contra IgG de pollo conjugado con alexa 488 (1:500; Jackson ImmunoResearch, 703-545-155, USA)
- de burro contra IgG de conejo conjugado con alexa 555(1:1000; Invitrogen, A31572, USA)
- de burro contra IgG de cabra conjugado con alexa 488 (1:500; Jackson ImmunoResearch, 705-545-003, USA)
- de burro contra IgG de cabra conjugado con cy3 (1:500; Jackson ImmunoResearch, 705-8165-003, USA)
- de cabra contra IgG de ratón conjugado con alexa 488 (1:1000; Invitrogen, USA)

Adquisición de imágenes

Las imágenes de campo claro y fluorescentes se obtuvieron con un microscopio de alto poder (DMLB, Leica, Alemania) equipado con un sistema de epifluorescencia y una cámara de video (DC100, Leica, Alemania). Las imágenes en campo claro de secciones de cerebro completas se obtuvieron con un microscopio estereoscópico (M165FC, Leica, Alemania). Las imágenes confocales se obtuvieron utilizando un microscopio Eclipse E800 Nikon C1.

5. Generación de BACs recombinantes

Para generar construcciones génicas de gran tamaño (mayores a 60 kb) se utilizó la técnica de recombinación en BACs desarrollada por Warming *et al.* (2005) y modificada por Wang *et al.* (2009). Este sistema utiliza una cepa de *E. coli* (SW102) que tiene integrado el profago λ defectivo con los genes *exo*, *bet* y *gam*, necesarios para la recombinación, bajo el promotor fuerte *pL* y controlado por el represor sensible a temperatura *cI857*. Mientras las bacterias son mantenidas a menos de 34 °C los genes de recombinación no se expresan, pero al incubar 15 min a 42 °C su expresión es rápidamente inducida y la recombinación homóloga se produce eficientemente. El método consiste en dos pasos de recombinación homóloga (Figura 51). En el primer paso, de selección positiva, se utiliza un casete de selección doble que expresa el gen *Aph*, que otorga la resistencia bacteriana a kanamicina, y el gen *rpsL*, que confiere sensibilidad a estreptomicina (Wang *et al.*, 2009). El casete se amplifica mediante PCR con *primers* que poseen brazos de homología de 50 pb, como mínimo, con la región del BAC que se desea modificar. El casete amplificado es electroporado en bacterias SW102 conteniendo el BAC inducidas a 42 °C y las bacterias se cultivan en kanamicina a 30 °C seleccionando aquellas que produjeron la inserción del casete. En el segundo paso, las bacterias seleccionadas son inducidas a 42 °C y electroporadas con un fragmento de ADN con extremos de homología por fuera del casete, este fragmento puede ser un producto de PCR o provenir de un plásmido. Finalmente, las bacterias se cultivan en un medio con estreptomicina a 30 °C seleccionándose aquellas que eliminaron el casete. Es importante observar que en el primer paso los brazos pueden tener como objetivo secuencias consecutivas o lejanas, hasta cien o más kb de distancia, y en el segundo paso la distancia mínima se encuentra determinada por los brazos de homología utilizados en el primero.

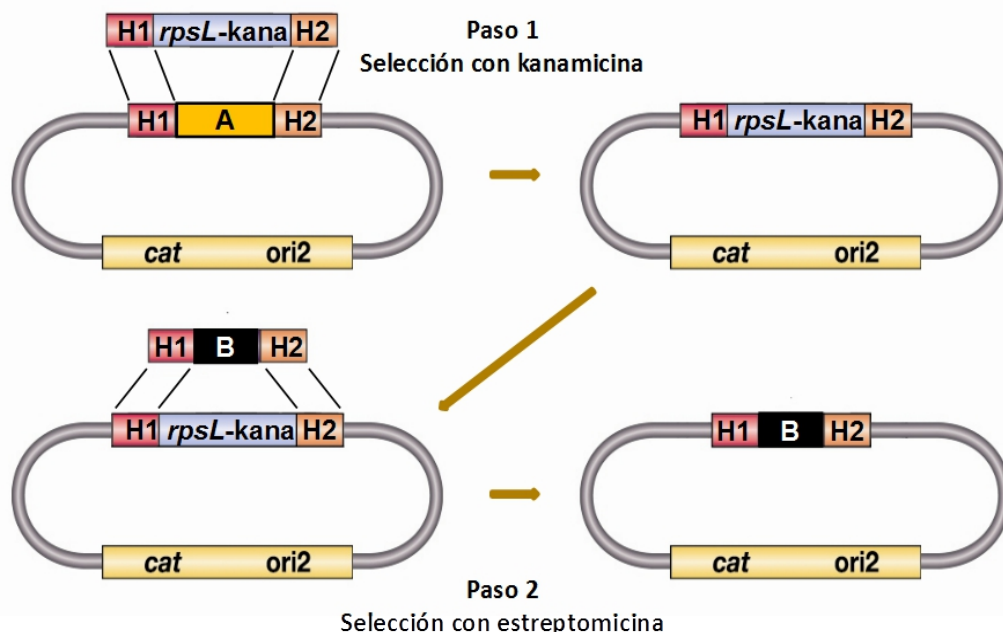


Figura 51. Recombinación homóloga en BACs. En el primer paso el casete *rpsL-kana* rodeado por brazos de homología con el BAC (H1 y H2) recombina sobre una región (A), solo las bacterias que recombinaron sobreviven a la selección con kanamicina. En el segundo paso un fragmento de ADN (B) rodeado de brazos de homología (pudiendo ser los mismos H1 y H2) recombina con el BAC obtenido en el paso anterior, solo las bacterias que pierden el casete *rpsL-kana* sobreviven a la selección con estreptomicina (Adaptado de Warming *et al.*, 2005). *cat*: resistencia a cloranfenicol; *ori2*: origen de replicación del BAC.

BAC [-65/+55]*Drd2*-T_d2

En un principio, se transformaron bacterias SW102 competentes crecidas a 30 °C con el BAC BX37 mediante electroporación y se seleccionaron en medio LB-agar con cloranfenicol (12,5 µg/ml). Las bacterias con BX37 se crecieron en LB a 30 °C hasta alcanzar entre 0,55 y 0,6 de densidad óptica a 600 nm. Luego, se incubaron durante 15 min en baño de agua a 42 °C en agitación constante. Se centrifugaron a 4000 g durante 5 min a 2 °C, el *pellet* se resuspendió en agua destilada (dos veces el volumen del cultivo) y se centrifugó dos veces. Finalmente las bacterias se resuspendieron en 50 µL de agua destilada cada 10 ml de cultivo inicial y se mantuvieron en hielo hasta la transformación por electroporación. Para el paso de selección positiva, 200 ng (1 o 2 µL) del producto de PCR pSK+rpsL+kana (Wang *et al.*, 2009), obtenido con los *primers* DELTA3'_S y DELTA3'_S y purificado por electroforesis en gel de agarosa 1%, se incubó con las bacterias durante 30 min procediendo luego a la transformación por electroporación y recuperación durante 30 min a 30 °C en medio SOC. Finalmente las bacterias se plaquearon en medio LB-agar con kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 30 °C durante 24 h. La correcta recombinação de los clones se controló mediante análisis de restricción con BamHI. Estas bacterias se prepararon de la misma manera que en el primer paso para una

nueva electroporación y selección negativa con estreptomycin. Se transformaron con el fragmento de 2729 pb resultante de la digestión del plásmido pBS-*Drd2*(-5/+0,12)-Td2-BX37extremo3' con SphI (cuya construcción explico en la sección siguiente). Las bacterias se plaquearon, en LB-agar con cloranfenicol (12,5 µg/ml) y estreptomycin (1 mg/ml) y se incubaron 24 h a 30 °C. La correcta recombinación de los clones se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de digestión con las enzimas BamHI, EcoRV, SpeI y XhoI producidos en reacciones independientes. El esquema de modificación de los BACs se muestra en la Figura 52.

BAC [-5/+55]*Drd2*-Td2

Para esta construcción solo se realizó un paso de selección positiva en el cual se transformó por electroporación bacterias *E. Coli* SW102 conteniendo el BAC [-65/+55]*Drd2*-Td2, previamente inducidas a 42 °C, con el casete contenido en el plásmido pSK+rpsL+kana amplificado por PCR con los *primers* DELTA5'_S y DELTA5'_aS. La correcta recombinación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% de los clones resultantes digeridos con la enzima de restricción EcoRI. El esquema de trabajo de la construcción se muestra en la Figura 52.

***Primers* para las deleciones de BACs**

Abajo se indican las secuencias de los *primers* utilizados en las recombinaciones. En minúscula se indican las regiones de homología con los BACs y en mayúscula las regiones que hibridan con el plásmido pSK+rpsL+kana en las reacciones de PCR para producir los casetes de recombinación.

- DELTA3'_S:

5'-ccggtcgccaccatggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtTCGAGGTCGACGGTATC-3'

- DELTA3'_aS:

5'-ggaaaactgtgtggctgtaatactgacacagtaaactccaggtttcgtggTCTAGAACTAGTGGATC-3'

- DELTA5'_S:

5'-tttgcatctgccgtttcgatcctcccgaattgactagtgggtaggcctgTCGAGGTCGACGGTATC-3'

- DELTA5'_aS:

5'-aaacaagctcatgacaaggggtctagcggaggatccagagaggttagctaacTAACCCTCACTAAAGGG-3'

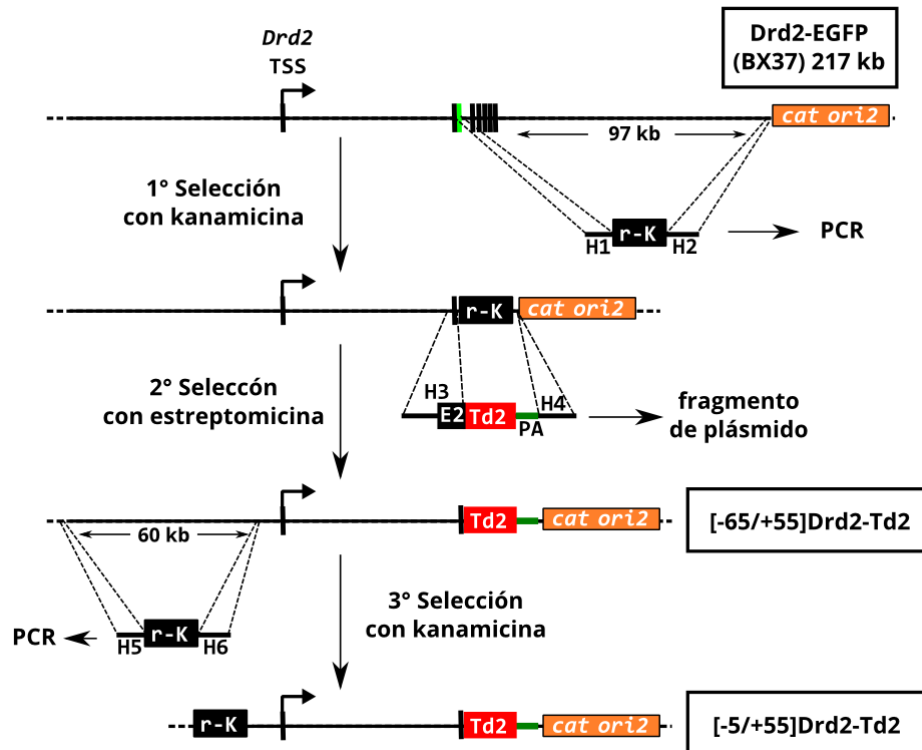


Figura 52. Recombinación en *Drd2*-EGFP (BX37). En el primer paso de recombinação se amplifica por PCR el casete *rspl*-Kana (*r-K*) con *primers* que tienen los brazos de homología H1 y H2 (DELTA3'_S y DELTA3'_aS respectivamente), se induce la recombinação y se selecciona con kanamicina. En el segundo paso se reemplaza por recombinação el casete *r-K* por el fragmento de digestión del plásmido pBS-*Drd2*(-5/+0,12)-Td2-BX37extremo3 que contiene un brazo de homología con el extremo 3' del intrón 1 de *Drd2* (H3) y el exón 2 (E2), seguido de Td2 y una secuencia de poliadenilación (PA), y un segundo brazo de homología con la región río abajo de *r-K* (H4), seleccionando con estreptomicina. Así se obtuvo el BAC [-65/+55]*Drd2*-Td2 que en un tercer paso se utilizó en una nueva ronda de recombinação con el casete *r-K* amplificado por PCR (DELTA5'_S y DELTA5'_aS) para generar la delección que dio lugar al BAC [-5/+55]*Drd2*-Td2.

6. Construcciones plasmídicas

Para la generación de las construcciones se utilizaron las técnicas de clonado molecular convencionales (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. J.F. Sambrook and D.W. Russell, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.). Como norma general se analizaron mediante secuenciación de Sanger todas las construcciones plasmídicas que contenían una secuencia obtenida directamente por amplificación por PCR. Para propagar los clones se utilizaron bacterias *E. coli* DH5α (Invitrogen, USA). Las bacterias transformadas con los plásmidos derivados del vector pZero-2 y pENTR/D-TOPO (Invitrogen, USA) se seleccionaron en medio LB-agar con kanamicina (50 µg/ml), las transformadas con plásmidos derivados de pBluescript_SK- (Stratagene-Agilent Technologies, USA) y pGEM (Promega, USA) en LB-agar con ampicilina (50 µg/ml). Solamente las construcciones conteniendo el casete GATEWAY

(Invitrogen, USA) se transformaron en la cepa *E. coli* DB3.1 (Invitrogen, USA) seleccionando en medio con cloranfenicol 170 µg/ml.

Plásmidos pZero-Drd2(-5/+10) y pZero-Drd2(+43/+53)

Para obtener estas construcciones, se digirió el BAC BX37 con *SpeI* y el producto se resolvió mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. Se purificaron del gel los fragmentos generados desde 7 a 15 kb (QIAquick, QIAGEN, Alemania) y se ligaron en el sitio *SpeI* de pZero-2 (Invitrogen, USA). Finalmente, se revisaron los clones resistentes a kanamicina (50 µg/ml) mediante análisis de restricción en búsqueda de las secuencias genómicas deseadas.

Plásmido pBS-Drd2(-5/+0,12)-Td2

En un primer paso se clonó una región de 750 pb, conteniendo al exón 2 del gen *Drd2* y parte de la región codificante de EGFP, en el sitio *EcoRV* del vector pZero-2, en el sentido del promotor de T7. Para esto, el fragmento de ADN fue obtenido mediante PCR con la ADN polimerasa Pfx (Invitrogen, USA) utilizando como molde el BAC BX37 y los *primers* 5'-TGC AAG ACT GCA TCA TCC TC-3' y TAG CGG CTG AAG CAC TGC A-3'. La construcción resultante se digirió con *XbaI* y se clonó en ella el fragmento de 5 kb obtenido de la digestión con *XbaI* del plásmido pZero-Drd2(-5/+10). En un segundo paso, se amplificó un fragmento de ADN de 2,3 kb, que codifica para Tdimer2 (Td2) y que seguidamente contiene el sitio de poliadenilación (poli-A) de SV40, utilizando como molde el plásmido nPE1-Tomato (Franchini *et al.*, 2011) y los *primers* 5'-TAT GGA TCC CGA TAA GGA TAC GAT GGT GGC-3' y 5'-ATA TGC GGC CGC ATC TTC CAC GTG T-3' (las secuencias subrayadas corresponden a los sitios de corte de *BamHI* y *NotI*, respectivamente). Este fragmento se clonó en el sitio *EcoRV* de pZero-2. En un tercer paso, se extrajo el fragmento de 2,3 kb conteniendo la región codificante de Td2 y el poli-A de SV40, resultante de la digestión parcial con *BamHI* y digestión total con *KpnI* del plásmido obtenido en el segundo paso, seguidamente se ligó en la construcción obtenida en el primer paso digerida con *BamHI* y *KpnI*. Como último paso se utilizó las enzimas *XbaI* (digestión Parcial) y *NotI* para escindir el fragmento de 8 kb, conteniendo los exones 1 y 2 y las regiones Td2 y SV40, y se clonó en el vector pBluescript_SK- digerido con *XbaI* y *NotI*.

Plásmido pBS-*Drd2*(-5/+10)-Td2

Para realizar esta construcción se utilizó el inserto del plásmido pZero-*Drd2*(-5/+10) de 15 kb liberado con la enzima *SpeI* y se ligó junto con el fragmento de 6 kb resultante de la digestión con *XbaI* del plásmido pBS(-5/+0,12) Td2 que contiene al exón 2 de *Drd2*, Td2 y al vector.

Plásmido pBS-*Drd2*(-5/+10)-Td2

Para realizar esta construcción se utilizó el inserto del plásmido pZero-*Drd2*(-5/+10) de 15 kb liberado con la enzima *SpeI* y se ligó junto con el fragmento de 6 kb resultante de la digestión con *XbaI* del plásmido pBS(-5/+0,12) Td2 que contiene el exón 2 de *Drd2*, Td2 y el vector.

Plásmido pZero-TK-*Pomc*-Td2

En un primer paso se clonó el promotor de TK del virus del *herpes simplex* en el vector pGEM-T easy mediante PCR, utilizando como molde un plásmido conteniendo su secuencia, con los *primers* 5'- ATA TC CCG GGC TTC ATC CCC GT-3' y 5'-ATA TAG ATC TGC GGC ACG CT-3' (las secuencias subrayadas corresponden a los sitios de corte de *SmaI* y *BglII*, respectivamente). En un segundo paso, se clonó la región conteniendo el exón 1, el intrón 1 y el exón 2 de *Pomc* seguida del ADN codificante de Td2 en dos fragmentos de PCR, utilizando como molde el plásmido nPE1-Tomato (Franchini *et al.*, 2011). El primer fragmento (2,16 kb) se obtuvo con los *primers* 5'-ATA TCC CGG GAC CAA ACG GGA-3' (la secuencia subrayada corresponde al sitio de corte de *SmaI*) y 5'-GCC TGT GAT ATC TGT TCC CCC T-3' y el segundo fragmento (3,4 kb) con los *primers* 5'-AGG GGG AAC AGA TAT CAC AGG C-3' y 5'-ATA TGC GGC CGC ATC TTC CAC GTG T-3' (la secuencia subrayada corresponde a *NotI*). Estos fragmentos se clonaron por separado en el sitio *EcoRV* de pZero-2. Para ensamblar la construcción que contendría todo el intrón de *Pomc* y Td2, se digirió el plásmido conteniendo la primera porción de *Pomc* con *XhoI* y *EcoRV* obteniendo un fragmento de 2,16 kb que se ligó con el plásmido conteniendo la segunda porción de *Pomc*, seguida de Td2 y el vector pZero-2, digerido con estas mismas enzimas. En el último paso se digirió el plásmido conteniendo el promotor de TK con *SmaI* y *BglII* y se utilizó la T7 ADN polimerasa (NEB, USA) para generar extremos romos, se resolvió en gel de agarosa al 2% y se purificó el fragmento de 265 pb que finalmente se ligó con el plásmido obtenido en segundo paso digerido con *SmaI*.

Plásmido pZero-Drd2(+43/+50)-TK-Pomc-Td2

Para esta construcción se digirió el plásmido pZero-Drd2(+43/+53) con la enzima XhoI, se aisló el fragmento de 7,7 kb y se utilizó la T7 ADN polimerasa (NEB) para generar extremos romos. Finalmente, se ligó el producto anterior con el plásmido pZero-TK-Pomc-Td2 previamente digerido con SmaI e incubado con fosfatasa alcalina (CIAP; Invitrogen).

Plásmido pBS-GATEWAY-TK-Pomc-Td2

Se utilizó como vector el plásmido pZero-TK-Pomc-Td2 digerido con SmaI que se ligó junto con el casete de GATEWAY de 3 kb (Invitrogen, USA) para convertir los plásmidos en vectores de destino. Posteriormente, se separó el inserto total de 7,6 kb del vector pZero2 con las enzimas KpnI y XhoI y se ligó en el sitio de clonado múltiple del plásmido pBluescript_SK- correspondiente a estas enzimas. La construcción resultante se propagó en *E. coli* DB3.1 (Invitrogen, USA) seleccionadas en medio LB con cloranfenicol 170 µg/ml.

Plásmido pBS-Drd2(-5/+0,12)-Td2-BX37extremo3'

Esta construcción se generó como intermediario en el paso de recombinación 3' del BAC *Drd2*(-65/+55)-Td2 permitiendo incluir a Td2 en el marco de lectura de *Drd2* y delecionar el extremo 3' del BAC (ver recombinación en BACs). En una primera instancia se amplificó por PCR el extremo 3' (región río abajo del gen *Drd2*) del BAC BX37 con los *primers* 5'-ATA TGC GGC CGC AGA AAT TCG ATG AT-3' y 5'-TTT CAA AAA CCT TCC CTG-3'. El fragmento de 732 pb resultante se clonó en pGEM-T Easy (Promega, USA). Posteriormente, se digirió la construcción con NotI, se aisló el fragmento de 351 pb y se clonó en el plásmido pBS-Drd2(-5/+0,12)-Td2 digerido con NotI.

Plásmidos pENTR+45 y pENTR+46

Se clonaron las regiones +45 y +46 del intrón de *Drd2* utilizando el kit para clonar pENTR/D-TOPO (Invitrogen, USA). Para esto se amplificó por PCR el *enhancer* +45 de 501 bp con los *primers* 5'-CAC CAA TGA GAG GTC GGG AAG-3' y 5'-TCC TCT CTT CTC CCT TC-3' (mm9_chr9:49,193,651-49,194,151), y el *enhancer* +46 de 512 bp con los *primers* 5'-CAC CAG CCA GTC TGT GGG ATC-3' y 5'-CCA GGA GAC CCA GGC AG-3' (mm9_chr9:49,194,245-49,194,756). Luego, se purificaron los productos de amplificación, se incubaron junto con el vector como sugiere el fabricante y se propagaron los plásmidos resultantes en *E. coli* DH5α.

Plásmidos pBS+45-TK-Pomc-Td2 y pBS+46-TK-Pomc-Td2

Para producir estas construcciones se recombinó el plásmido pBS-GATEWAY-TK-Pomc-Td2 con pENTR+45 en una reacción y con pENTR+46 en otra reacción. La recombinación entre los sitios *attL* de los plásmidos pENTR y *attR* del plásmido de destino se catalizaron con la enzima *LR Clonase II* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las construcciones resultantes se propagaron en *E. coli* DH5α.

Plásmidos para lentivirus 46-EGFP y 46-CRE

Para estas construcciones se utilizaron el vector lentiviral FUGW, generado por Lois *et al.* (2002) y modificado por Avale *et al.* (2008), y el vector lentiviral GAD-CRE, generado por Tolu *et al.* (2010). Se eliminaron las regiones regulatorias de FUGW digiriendo con BamHI y NheI y las de GAD-CRE digiriendo con XhoI y SmaI, obteniendo los vectores lentivirales solo con las secuencias codificantes para EGFP (8,7 kb) y para CRE (10 kb). Se utilizó la T7 ADN polimerasa para generar extremos romos en ambos vectores y se clonó en estos el casete de GATEWAY seguido de TK. Este último casete se obtuvo de la digestión con HindIII, e incubación con T7 ADN polimerasa, del plásmido pBluescript_SK- con el fragmento de la amplificación por PCR del plásmido pBS-GATEWAY-TK-Pomc-Td2 con los *primers* 5'-GCA ATT AAC CCT CAC TAA AGG-3' y 5'-ATC TGC GGC ACG CTG TTG-3'. Las construcciones resultantes son plásmidos de destino para el sistema GATEWAY y se mezclaron con pENTR+46 en reacciones con *LR Clonase II* independientes para generar finalmente los plásmidos 46-EGFP y 46-CRE. Estos se empaquetaron en partículas lentivirales como se describe a continuación.

7. Producción e inyección de lentivirus

Producción de lentivirus 46-CRE y 46-EGFP

Para la generación de partículas lentivirales se utilizó el protocolo previamente descrito por Avale *et al.* (2008, 2011). Los cultivos celulares de HEK-293T se realizaron en medio DMEM conteniendo 4,5 g/l de glucosa (New England Biolabs), 10% de suero fetal bovino (Invitrogen), 0,5 mM L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina y se mantuvieron a 37 °C y 5% CO₂. Para la transfección se plaquearon alrededor de 1.000.000 células por placa (10 cm), cuantificadas previamente en cámara de Neubauer. Al alcanzar la confluencia del 90% (aproximadamente 48 h), se cotransfectó por placa con 3 µg de plásmidos 46-CRE o 46-EGFP, y los vectores *helpers*, 3 µg de CMVΔ8.9 y 1,8 µg de CMV-VSVg (que codifican proteínas de la

envoltura y el empaquetamiento, respectivamente), utilizando 15 μ L de Lipofectamina Plus (Invitrogen) y 15 μ L de solución plus (Invitrogen), en 5,5 ml finales de medio Opti-MEM (Invitrogen) preparados según instrucciones del fabricante. Se incubó entre 5 y 12 h y se reemplazó el medio por DMEM. Pasadas 48 h desde la transfección se cosecharon las partículas virales, se trató con DNase (50 UI) a 37 °C durante 20 min, luego se pasó el medio con las partículas a través de un filtro de 0,45 μ m y se concentraron las partículas virales por ultracentrifugación a 100.000 g a 4 °C durante 2 horas (Beckman Coulter). Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 10 μ L de PBS, por placa transfectada, incubando 2 h a 4° hasta la preparación de alícuotas y posterior almacenamiento a -80 °C. La manipulación de los cultivos celulares se realizó trabajando bajo campana de flujo laminar (BSL-2).

Inyección de lentivirus 46-CRE y 46-EGFP

Para las inyecciones lentivirales se usaron ratones machos Ai14 (en el caso de 46-CRE) y C57 (46-EGFP) adultos (mayores a 8 semanas). Se anestesiaron los ratones con Ketamina (1 mg/kg)/Xilasina (10 mg/kg), se rasuraron las cabezas y se desinfectaron con yodopovidona. Se posicionaron en el estereotáxico (Stoelting Co., USA). Se expuso el cráneo con una mínima incisión y se identificó el bregma utilizado como punto de referencia de las coordenadas. Se identificaron las coordenadas anteroposteriores (AP) y mediolaterales (ML) respectivas al sitio de inyección y se realizaron los agujeros con un microtorno. Se inyectó el lentivirus utilizando una aguja de 36g acoplada a una jeringa Hamilton de 10 μ L accionada por una microbomba de inyección (Chemxy Inc., F100, USA). Para el estriado se utilizaron las coordenadas AP +0,7, ML 1,8, dorsoventral (DV) -3,2 y para el VTA las coordenadas AP -3,1; ML 0,5; DV -4,6. Por inyección se utilizó un volumen final de 1,5 μ L en 10 minutos (0,15 μ L/min). Al finalizar se cerró la herida con sutura y se mantuvieron los ratones a 37 °C hasta su recuperación. Finalmente, se mantuvieron alojados durante 21 días y luego se disecaron los cerebros como se describe en el punto 4. Como guía para las coordenadas de referencia se utilizó el atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2004).

8. Herramientas y análisis bioinformáticos

Conservación y marcas de histonas (*Genome Browser*)

Todos los datos de conservación y marcas de histonas se obtuvieron a través del sitio web *UCSC-Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu/>) en la sección *Genome Browser*. Los datos de conservación mostrados con las herramientas de alineamientos múltiples (Multiz),

phyloP y elementos conservados determinados por phastCons se configuraron a través del track “30-Way Multiz Alignment & Conservation” en el ensamble de ratón NCBI37/mm9 y el track “Vertebrate Multiz Alignment & Conservation (100 Species)” en el ensamble de humano GRCh37/hg19. La información de las modificación de histonas se obtuvo a través del ensamble de ratón NCBI37/mm9 configurando el track “Histone Mods by ChIP-seq from ENCODE/LICR”.

Análisis de TFs con UniPROBE

Las secuencias utilizadas para la búsqueda FTs se obtuvieron a través de sitio web *UCSC-Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu/>). Se utilizaron las secuencias genómicas del ensamble de ratón del 2007 (NCBI37/mm9) correspondientes a cada elemento conservado de *Drd2* de interés. Sus posiciones en el genoma son: elemento -2 = chr9:49146615-49146788; promotor proximal = chr9:49148375-49148877; elemento +4,5 = chr9:49153209-49153577; elemento +45 = chr9:49193777-49193957; elemento +46 = chr9:49386369-49386551. El análisis de los sitios de unión de TFs se realizó utilizando las herramientas del sitio web de UniPROBE (Hume *et al.*, 2015; http://the_brain.bwh.harvard.edu/uniprobe/), se consideraron solo los sitios de unión putativos con puntajes de enriquecimiento mayores o iguales a 0,45 (por defecto), que son los parámetros recomendados por los autores.

Alineamientos de elementos conservados (ClustalW)

Las secuencias genómicas de los elementos conservados entre diferentes especies, de interés en la búsqueda de sitios de unión de TFs, se alinearon utilizando el programa de alineamiento múltiple ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Se utilizaron los valores de configuración para alineamientos de ADN por defecto (Tipo de alineamiento: lento; Matriz peso de DNA: IUB; Apertura de *gap*: 10; Extensión de *gap*: 0,20; Distancia mínima entre *gaps*: 5; Sin iteraciones; *Clustering*: Neighbour-joining -NJ-). Las localizaciones de las secuencias utilizadas para alinear los elementos conservados entre las diferentes especies se enumeran a continuación.

- Elemento -2:

Humano (hg19) = chr11:113348084-113348257

Ratón (mm9) = chr9:49146615-49146788

Caballo (equCab2) = chr7:21895090-21895355

Opossum (monDom5) = chr4:238904622-238904901

- Elemento +4,5:

Humano (hg19) = chr11:113340732-113341084

Ratón (mm9) =chr9:49153209-49153577

Caballo (equCab2) =chr7:21887809-21888170

Opossum (monDom5) =chr4:238912184-238912456

- Elemento +45:

Humano (hg19) = chr11:113306228-113307013

Ratón (mm9) = chr9:49193662-49194106

Caballo (equCab2) = chr7:21856180-21857054

Opossum (monDom5) = chr4:238967127-238967683

- Elemento +46:

Humano (hg19) = chr11:113305737-113306297

Ratón (mm9) = chr9:49194206-49194855

Opossum (monDom5) = chr4:238967593-238968439

Gallina (galGal3) = chr24:5872651-5874402

Pavo (melGal1) = chr26:6071888-6073454

Lagarto (anoCar2) = chrUn_GL343354:437333-438642

ANEXO

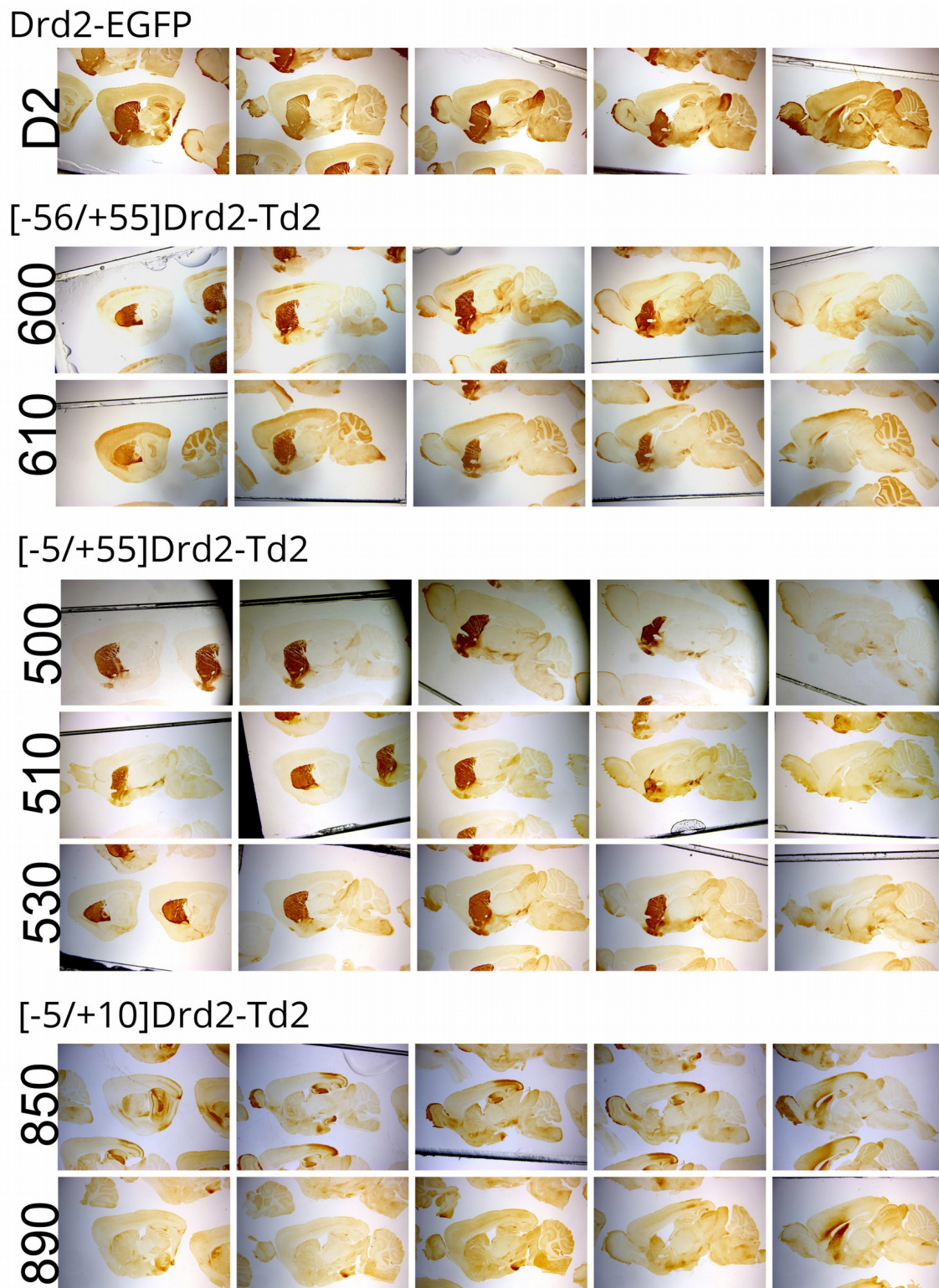
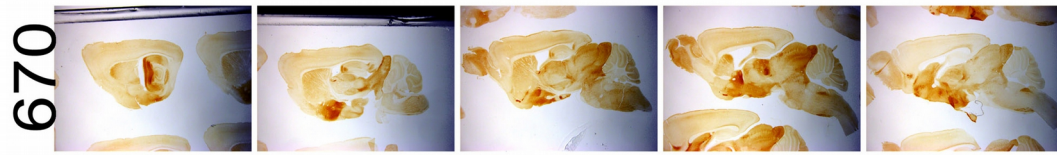
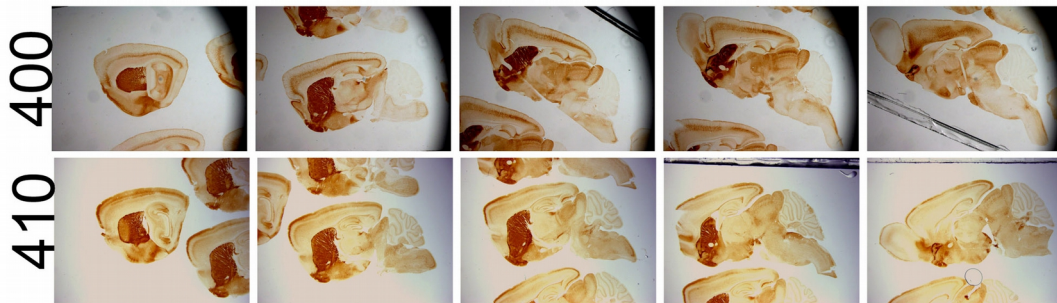


Figura suplementaria 1. Inmunohistoquímica contra las proteínas reporteras en cortes sagitales de las diferentes líneas de ratones transgénicos. A la izquierda se indica el número de línea o animal fundador. La Figura sigue abajo.

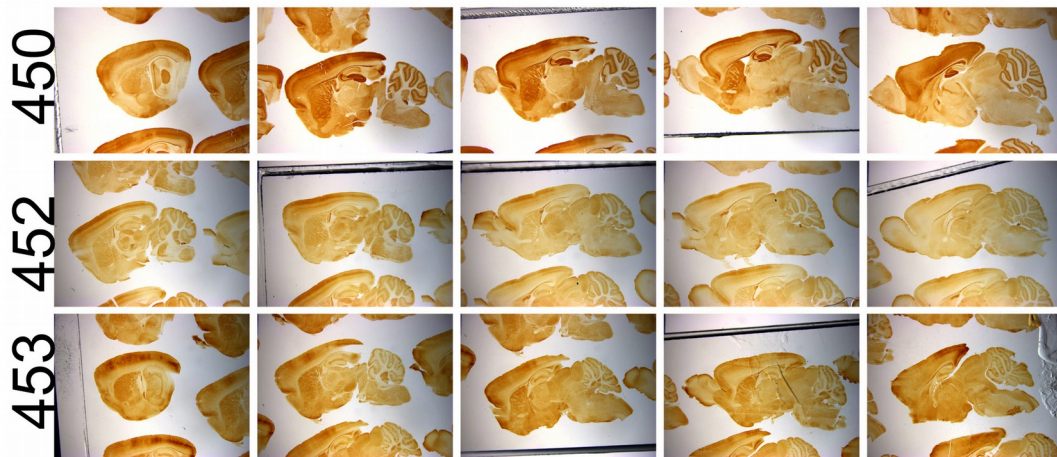
[-5/+0]Drd2-Td2



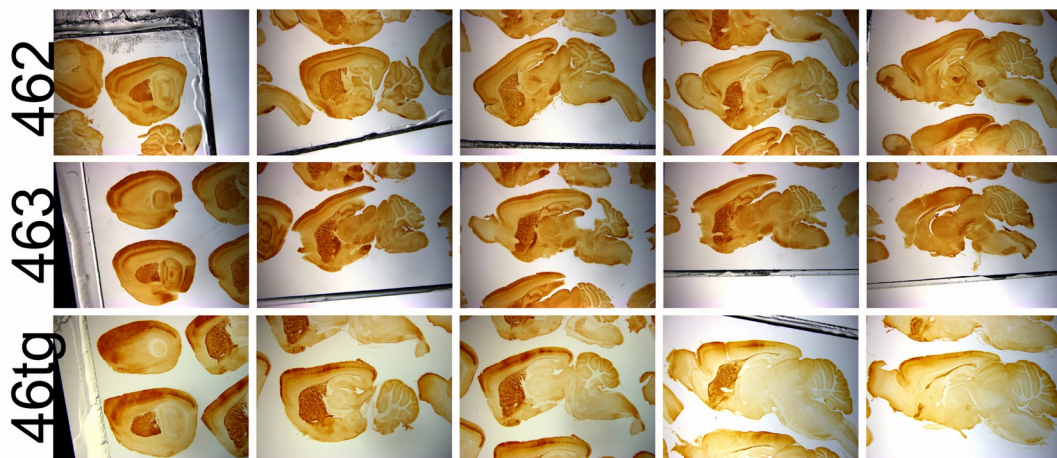
[+43/+50]Drd2-Td2



[+45]Drd2-Td2



[+46]Drd2-Td2



Continuación Figura suplementaria 1. Los cortes del transgén +46Drd2-Td2 ratón 46tg corresponden a un animal fundador. Cortes de cerebros de ratones mayores a 30 días, mostrando un barrido del eje lateral medial (izquierda a derecha respectivamente).

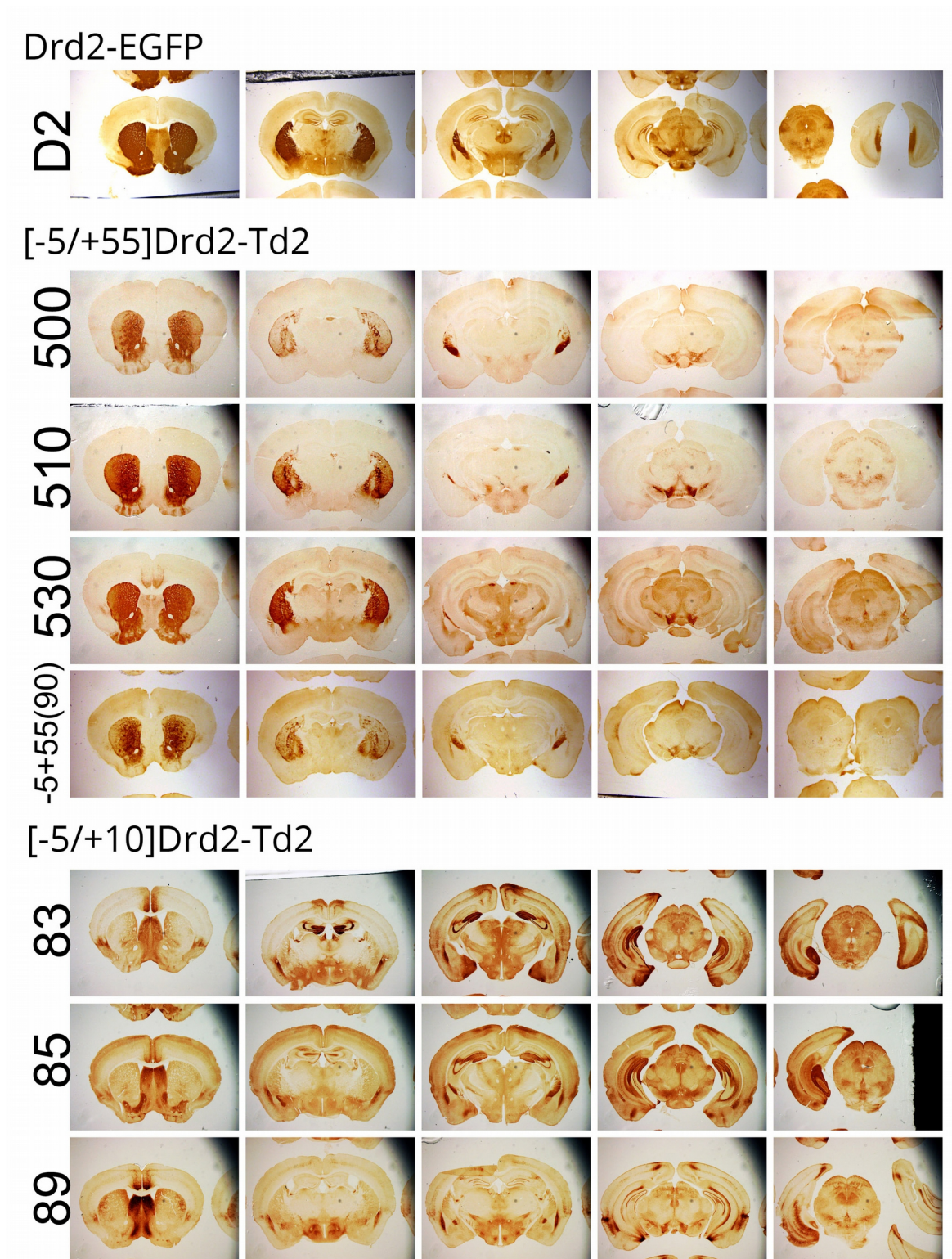
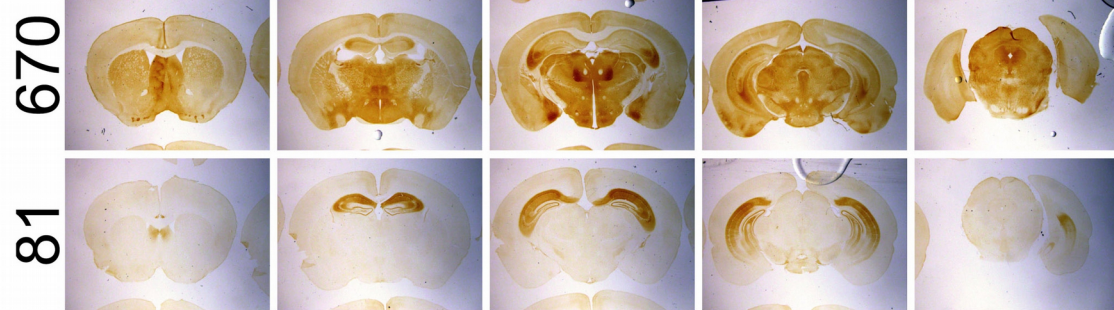
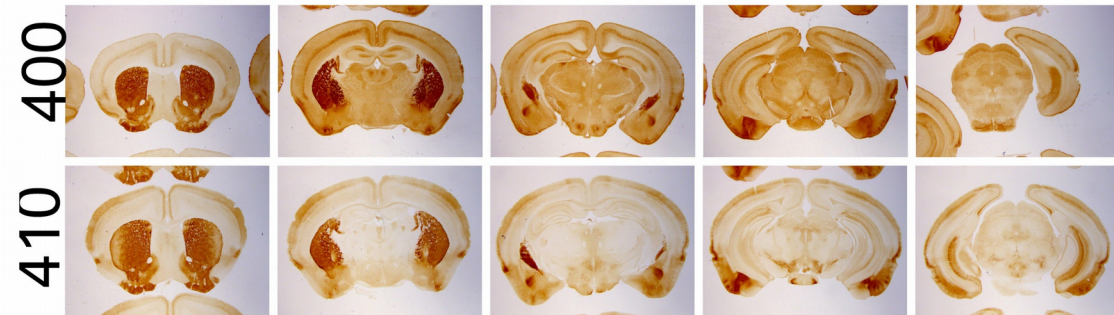


Figura suplementaria 2. Inmunohistoquímica contra las proteínas reporteras en cortes coronales de las diferentes líneas de ratones transgénicos. A la izquierda se indica el número de línea o animal fundador. Barrido de cortes rostro caudales (de izquierda a derecha). Los cortes del transgén [-5/+55]*Drd2*-Td2 ratón -5/+55(90) corresponden a un animal fundador. Cortes de cerebros de ratones mayores a 30 días. La Figura sigue abajo.

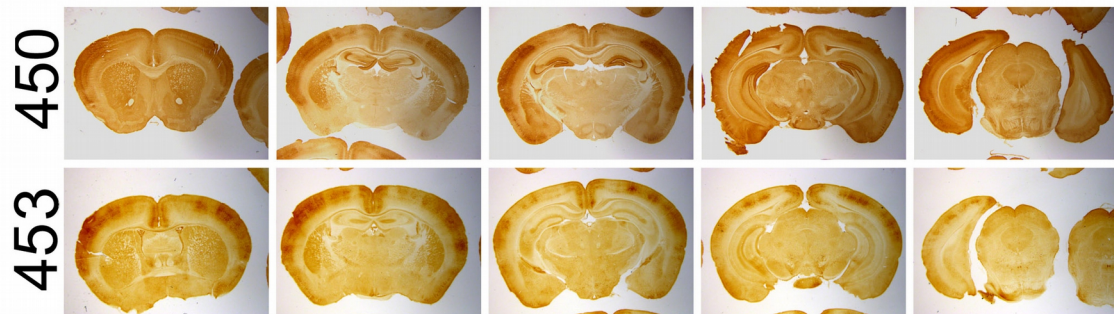
[-5/+0]Drd2-Td2



[+43/+50]Drd2-Td2



[+45]Drd2-Td2



Continuación Figura suplementaria 2.

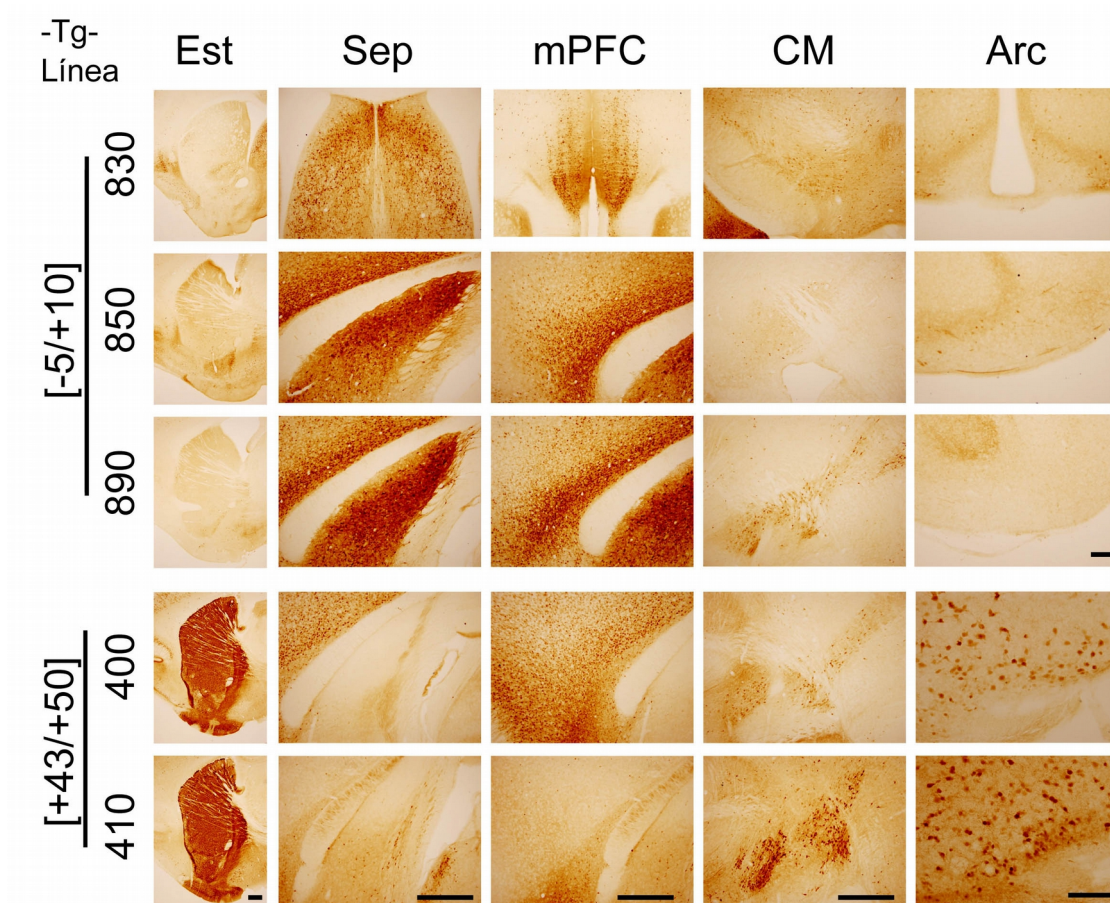


Figura suplementaria 3. Inmunohistoquímica contra Td2 en cortes de cerebro de las diferentes líneas de los transgenes [-5/+10]*Drd2*-Td2 y [+43/+50]*Drd2*-Td2. Las regiones cerebrales que se muestran son estriado (Est), *septum* (Sep), mPFC, cerebro medio y núcleo arcuato (Arc). Las escalas del Est, Sep, mPFC, cerebro medio representan 500 μ m y las del Arc 100 μ m.

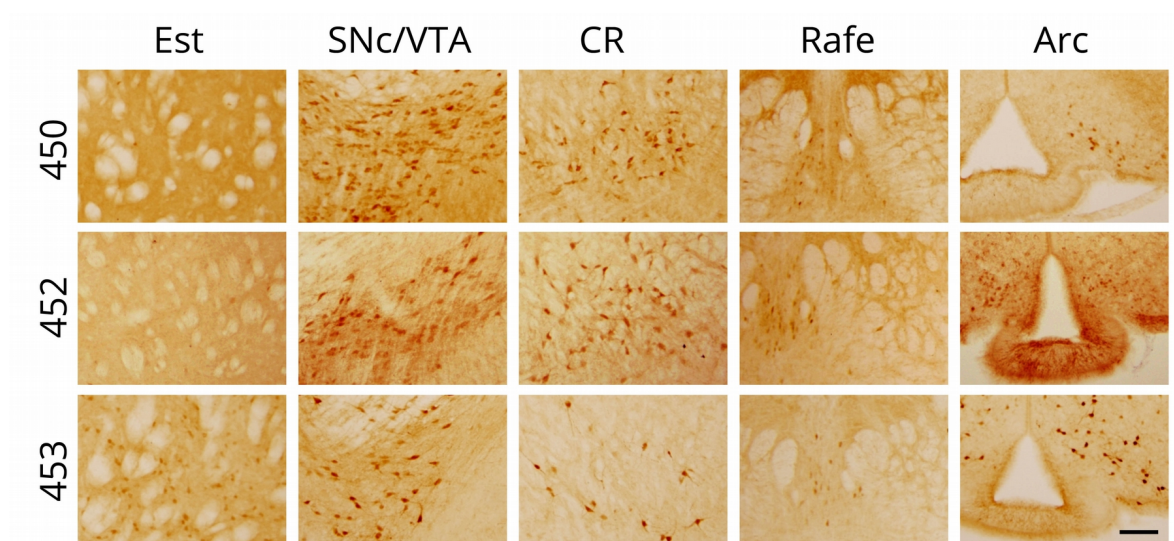


Figura suplementaria 4. Inmunohistoquímica contra Td2 en cortes de cerebro coronales de las diferentes líneas del transgén [+45]*Drd2*-Td2. Estriado (Est), campo retrorubral, núcleo del rafe (Rafe) y arcuato (Arc) Escala 100 μ m.

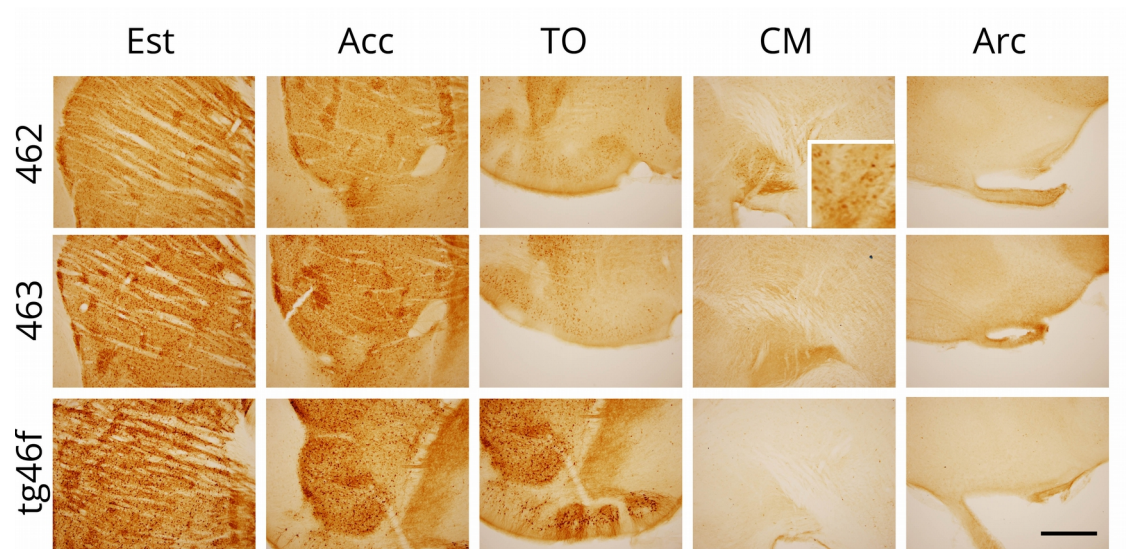


Figura suplementaria 5. Inmunohistoquímica contra Td2 en cortes de cerebro sagitales de las diferentes líneas del transgén [+46]*Drd2*-Td2. Estriado dorsal (Est), núcleo accumbens (Acc), tubérculo olfatorio (TO), cerebro medio y arcuato (Arc) Escala 500 μ m.

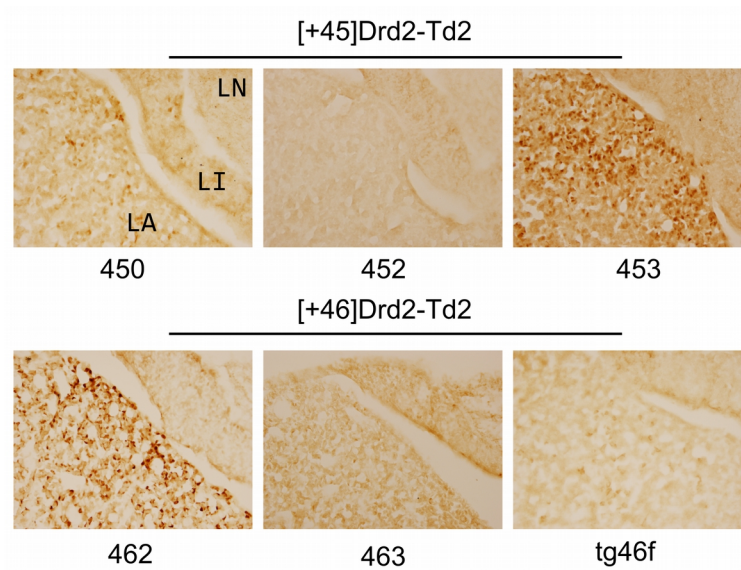


Figura suplementaria 6. Inmunohistoquímica contra Td2 en hipófisis de ratones [+45]*Drd2*-Td2 y [+46]*Drd2*-Td2. La expresión de de Td2 en el lóbulo anterior (LA) en las diferentes líneas es muy variable, no se observa expresión en el lóbulo neural (LN) ni en el lóbulo intermedio (LI) en ninguna de las líneas generadas.

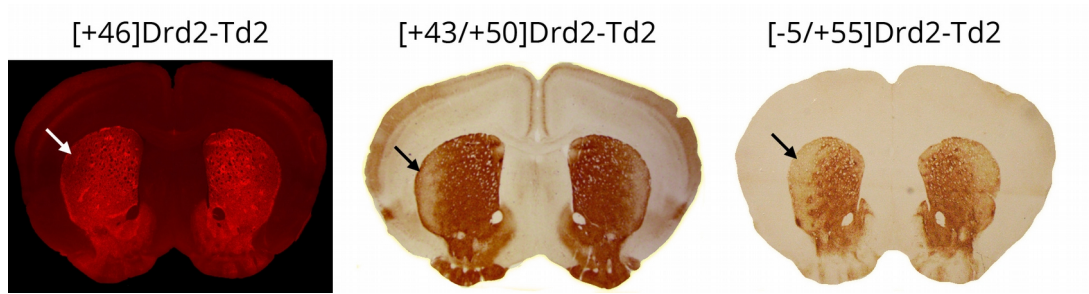


Figura suplementaria 7. Expresión de Td2 disminuida en el estriado. Algunas líneas reporteras con *enhancers* que dirigen la estriatal presentan disminución en la región dorsolateral (flechas), hecho independiente del tamaño del transgén.

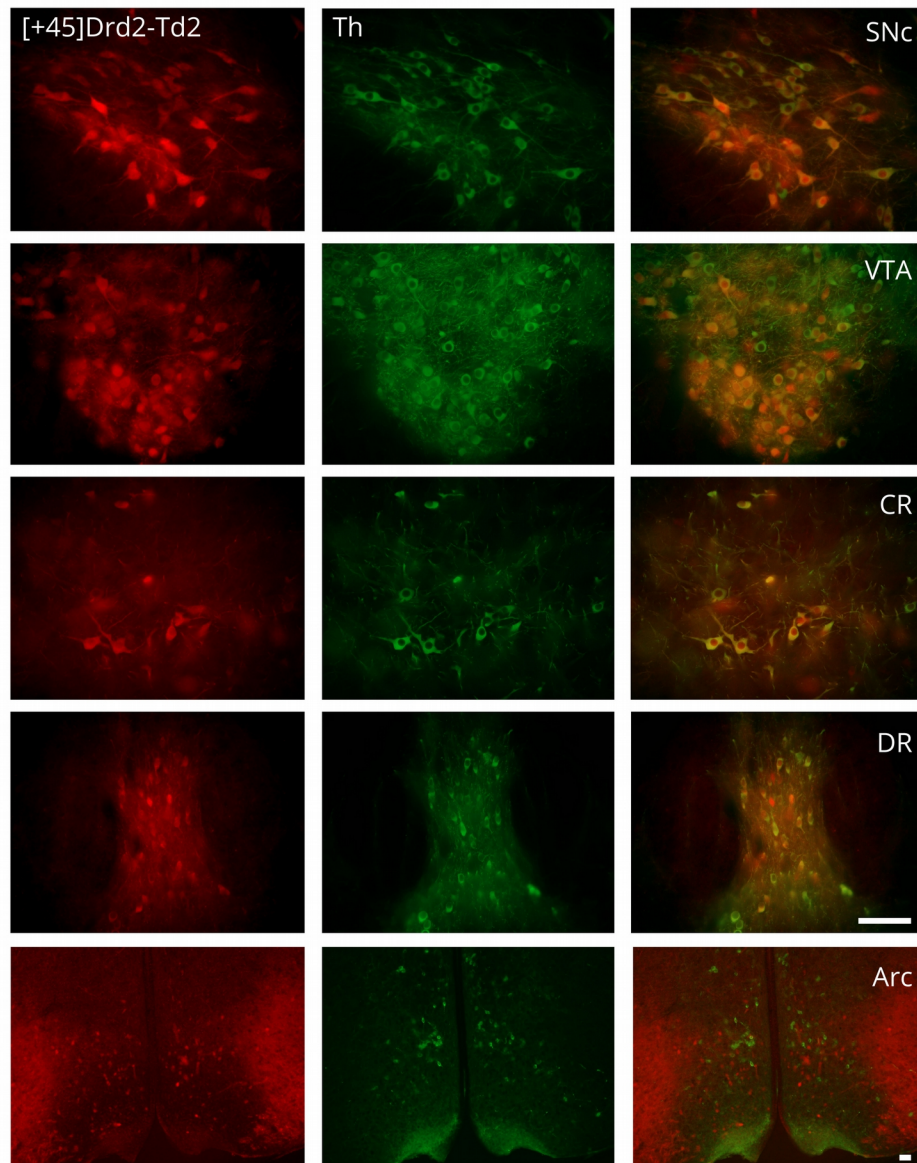


Figura suplementaria 8. Td2 y TH en ratones [+45]Drd2-Td2. La expresión de Td2 (Rojo) colocaliza con TH (Verde) en diferentes grados en la SNc, el VTA, el campo retrorubral (CR), el rafe dorsal (DR). En el núcleo arcuato del hipotálamo (Arc) la colocalización con TH no es detectable. Escala 100 μ m.

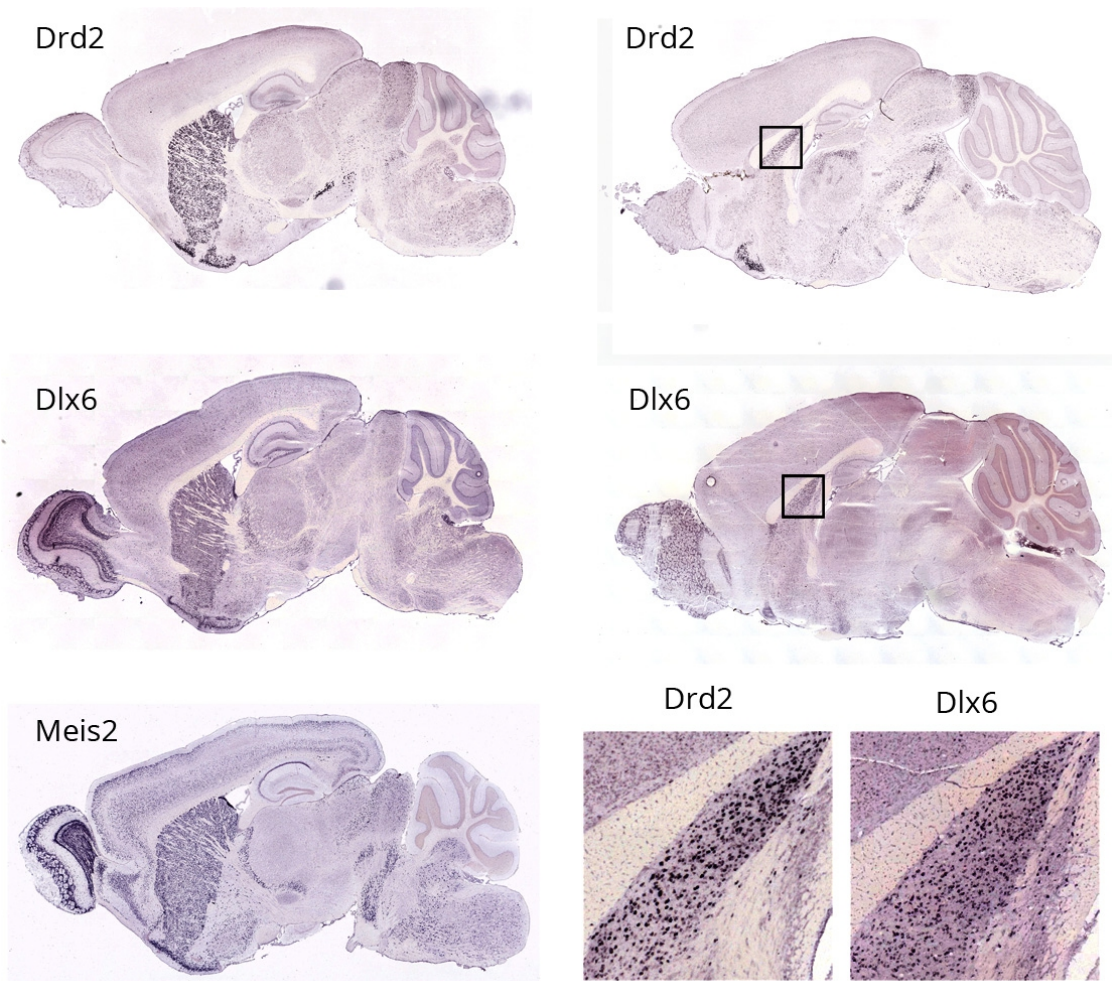


Figura suplementaria 9. Izquierda: *in situ* de los factores de transcripción *Dlx6* y *Meis2* en cerebro donde se observa altos niveles de ARNm en el estriado similares a los observados para *Drd2*. Derecha: comparación de los niveles septales de *Dlx6* y *Drd2* (Imágenes obtenidas del *Allen Brain Atlas*, <http://www.brain-map.org/>.)

BIBLIOGRAFÍA

- Albin, R.L., Young, a B., y Penney, J.B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366-375.
- Alcantara, A.A., Chen, V., Herring, B.E., Mendenhall, J.M., y Berlanga, M.L. (2003). Localization of dopamine D2 receptors on cholinergic interneurons of the dorsal striatum and nucleus accumbens of the rat. *Brain Res.* 986, 22-29.
- Arango, V., Underwood, M.D., Boldrini, M., Tamir, H., Kassir, S.A., Hsiung, S., Chen, J.J., y Mann, J.J. (2001). Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology* 25, 892-903.
- Arnosti, D.N., y Kulkarni, M.M. (2005). Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards? *J. Cell. Biochem.* 94, 890-898.
- Arnosti, D.N., Barolo, S., Levine, M., y Small, S. (1996). The eve stripe 2 enhancer employs multiple modes of transcriptional synergy. *Development* 122, 205-214.
- Avale, M.E., Faure, P., Pons, S., Robledo, P., Deltheil, T., David, D.J., Gardier, A.M., Maldonado, R., Granon, S., Changeux, J.-P., et al. (2008). Interplay of beta2* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15991-15996.
- Avale, M.E., Chabout, J., Pons, S., Serreau, P., De Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., Bourgeois, J.-P., Maskos, U., Changeux, J.-P., y Granon, S. (2011). Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice. *FASEB J.* 25, 2145-2155.
- Barolo, S. (2012). Shadow enhancers: Frequently asked questions about distributed cis-regulatory information and enhancer redundancy. *BioEssays* 34, 135-141.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., y Zhao, K. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* 129, 823-837.
- Beaulieu, J., y Gainetdinov, R.R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 63, 182-217.
- Behan, M., y Haberly, L.B. (1999). Intrinsic and efferent connections of the endopiriform nucleus in rat. *J. Comp. Neurol.* 408, 532-548.
- Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., Stephen, S., Kent, W.J., Mattick, J.S., y Haussler, D. (2004). Ultraconserved elements in the human genome. *Science* 304, 1321-1325.
- Bello, E.P., Mateo, Y., Gelman, D.M., Noaín, D., Shin, J.H., Low, M.J., Alvarez, V. a, Lovinger, D.M., y Rubinstein, M. (2011). Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat. Neurosci.* 14, 1033-1038.
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. a, Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T.R., Margulies, E.H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E.T., Thurman, R.E., et al. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799-816.

- Björklund, A., y Dunnett, S.B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30, 194-202.
- Blanchette, M., Kent, W.J., Riemer, C., Elnitski, L., Smit, A.F.A., Roskin, K.M., Baertsch, R., Rosenbloom, K., Clawson, H., Green, E.D., et al. (2004). Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner. *Genome Res.* 14, 708-715.
- Blow, M.J., McCulley, D.J., Li, Z., Zhang, T., Akiyama, J. a, Holt, A., Plajzer-Frick, I., Shoukry, M., Wright, C., Chen, F., et al. (2010). ChIP-Seq identification of weakly conserved heart enhancers. *Nat. Genet.* 42, 806-810.
- Bouthenet, M.-L., Souil, E., Martres, M.-P., Sokoloff, P., Giros, B., y Schwartz, J.-C. (1991). Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res.* 564, 203-219.
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., y Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263-1268.
- Buck, M.J., y Lieb, J.D. (2006). A chromatin-mediated mechanism for specification of conditional transcription factor targets. *Nat. Genet.* 38, 1446-1451.
- Buckholtz, J.W., Treadway, M.T., Cowan, R.L., Woodward, N.D., Li, R., Ansari, M.S., Baldwin, R.M., Schwartzman, A.N., Shelby, E.S., Smith, C.E., et al. (2010). Dopaminergic network differences in human impulsivity. *Science* 329, 532.
- Bulger, M., y Groudine, M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* 144, 327-339.
- Bunzow, J.R., Tol, H.H.M. Van, Grandy, D.K., Albert, P., Salon, J., Christie, M., Machida, C. a., Neve, K. a., y Civelli, O. (1988). Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336, 783-787.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N.B., y Bernardi, G. (1996). basal ganglia. 19-24.
- Capetian, P., Pauly, M.G., Azmita, L.M., y Klein, C. (2014). Striatal cholinergic interneurons in isolated generalized dystonia Rationale and perspectives for stem cell-derived cellular models. 8, 1-9.
- Carlsson, a (1988). The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1, 179-186.
- Carlsson, a, Lindqvist, M., y Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180, 1200.
- Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M.A., Spina, L., Cadoni, C., Acquas, E., Carboni, E., Valentini, V., y Lecca, D. (2004). Dopamine and drug addiction: The nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* 47, 227-241.
- Choi, T., Huang, M., Gorman, C., y Jaenisch, R. (1991). A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3070-3074.

- Cookson, W., Liang, L., Abecasis, G., Moffatt, M., y Lathrop, M. (2009). Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat. Rev. Genet.* 10, 184-194.
- Copeland, N.G., Jenkins, N. a, y Court, D.L. (2001). Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat. Rev. Genet.* 2, 769-779.
- Creyghton, M.P., Cheng, A.W., Welstead, G.G., Kooistra, T., Carey, B.W., Steine, E.J., Hanna, J., Lodato, M.A., Frampton, G.M., Sharp, P.A., et al. (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21931-21936.
- Dahlström, A., y Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20, 398-399.
- Deaton, A.M., y Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010-1022.
- Deng, Q., Andersson, E., Hedlund, E., Alekseenko, Z., Coppola, E., Panman, L., Millonig, J.H., Brunet, J.-F., Ericson, J., y Perlmann, T. (2011). Specific and integrated roles of Lmx1a, Lmx1b and Phox2a in ventral midbrain development. *Development* 138, 3399-3408.
- Doron, R., Fridman, L., y Yadid, G. (2006). Dopamine-2 receptors in the arcuate nucleus modulate cocaine-seeking behavior. *Neuroreport* 17, 1633-1636.
- Dorschner, M.O., Hawrylycz, M., Humbert, R., Wallace, J.C., Shafer, A., Kawamoto, J., Mack, J., Hall, R., Goldy, J., Sabo, P.J., et al. (2004). High-throughput localization of functional elements by quantitative chromatin profiling. *Nat. Methods* 1, 219-225.
- Draaken, M., Knapp, M., Pennimpede, T., Schmidt, J. M., Ebert, A. K., Rösch, W., ... & Reutter, H. (2015). Genome-wide Association Study and Meta-Analysis Identify ISL1 as Genome-wide Significant Susceptibility Gene for Bladder Exstrophy. *PLoS genetics*, 11(3), e1005024-e1005024.
- Fragkouli, A., van Wijk, N.V., Lopes, R., Kessar, N., y Pachnis, V. (2009). LIM homeodomain transcription factor-dependent specification of bipotential MGE progenitors into cholinergic and GABAergic striatal interneurons. *Development* 136, 3841-3851.
- Franchini, L.F., López-Leal, R., Nasif, S., Beati, P., Gelman, D.M., Low, M.J., de Souza, F.J.S., y Rubinstein, M. (2011). Convergent evolution of two mammalian neuronal enhancers by sequential exaptation of unrelated retroposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15270-15275.
- Frankel, N., Davis, G.K., Vargas, D., Wang, S., Payre, F., y Stern, D.L. (2010). Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers. *Nature* 466, 490-493.
- Furger, A., O'Sullivan, J.M., Binnie, A., Lee, B.A., y Proudfoot, N.J. (2002). Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev.* 16, 2792-2799.
- Furniss, D., Lettice, L. a., Taylor, I.B., Critchley, P.S., Giele, H., Hill, R.E., y Wilkie, A.O.M. (2008). A variant in the sonic hedgehog regulatory sequence (ZRS) is associated with triphalangeal thumb and deregulates expression in the developing limb. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2417-2423.

- Gamlin, P.D.R. (2006). The pretectum: connections and oculomotor-related roles. *Prog. Brain Res.* 151, 379-405.
- Gaszner, M., y Felsenfeld, G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 7, 703-713.
- Gerfen, C.R., y Wilson, C.J. (1996). Integrated systems of the CNS, part III - Cerebellum, basal ganglia, olfactory system (Elsevier).
- Ghiasvand, N. M., Rudolph, D. D., Mashayekhi, M., Brzezinski IV, J. A., Goldman, D., y Glaser, T. (2011). Deletion of a remote enhancer near ATOH7 disrupts retinal neurogenesis, causing NCRNA disease. *Nature neuroscience*, 14(5), 578-586.
- Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P., Riou, J.F., Emorine, L.J., y Schwartz, J.C. (1989). Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342, 923-926.
- Giros, B., Martres, M.P., Pilon, C., Sokoloff, P., y Schwartz, J.C. (1991). Shorter variants of the D3 dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 1584-1592.
- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M.L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U.B., Nowak, N.J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M.E., et al. (2003). A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425, 917-925.
- González de Aguilar, J.L., Malagón, M.M., Vázquez-Martínez, R.M., Martínez-Fuentes, A.J., Tonon, M.C., Vaudry, H., y Gracia-Navarro, F. (1999). Differential effects of dopamine on two frog melanotrope cell subpopulations. *Endocrinology* 140, 159-164.
- Grandy, D.K., Marchionni, M. a, Makam, H., Stofko, R.E., Alfano, M., Frothingham, L., Fischer, J.B., Burke-Howie, K.J., Bunzow, J.R., y Server, a C. (1989). Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 9762-9766.
- Graybiel, a M. (1990). The basal ganglia and the initiation of movement. *Rev. Neurol. (Paris)*. 146, 570-574.
- Graybiel, a M. (2000). The basal ganglia. *Curr. Biol.* 10, R509-R511.
- Haberly, L.B., y Price, J.L. (1978). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 178, 711-740.
- Halász, B., Fuxe, K., Agnati, L.F., Kalia, M., Goldstein, M., Andersson, K., Härfstrand, A., y Clark, B. (1985). *The Dopaminergic System* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).
- Haznedar, M.M., Buchsbaum, M.S., Hazlett, E.A., Shihabuddin, L., New, A., y Siever, L.J. (2004). Cingulate gyrus volume and metabolism in the schizophrenia spectrum. *Schizophr. Res.* 71, 249-262.
- Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. a, et al. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 311-318.

- Heintzman, N.D., Hon, G.C., Hawkins, R.D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L.F., Ye, Z., Lee, L.K., Stuart, R.K., Ching, C.W., et al. (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459, 108-112.
- Ho, J.W.K., Jung, Y.L., Liu, T., Alver, B.H., Lee, S., Ikegami, K., Sohn, K.-A., Minoda, A., Tolstorukov, M.Y., Appert, A., et al. (2014). Comparative analysis of metazoan chromatin organization. *Nature* 512, 449-452.
- Hoffman, W.H., y Haberly, L.B. (1996). Kindling-induced epileptiform potentials in piriform cortex slices originate in the underlying endopiriform nucleus. *J. Neurophysiol.* 76, 1430-1438.
- Hong, J.-W., Hendrix, D. a, y Levine, M.S. (2008). Shadow enhancers as a source of evolutionary novelty. *Science* 321, 1314.
- Hornykiewicz, O. (1970). The metabolism of brain dopamine in human parkinsonism. *Riv. Patol. Nerv. Ment.* 91, 281-286.
- Hume, M.A., Barrera, L.A., Gisselbrecht, S.S., y Bulyk, M.L. (2015). UniPROBE, update 2015: new tools and content for the online database of protein-binding microarray data on protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 43, D117-D122.
- Hwang, C.K., D'Souza, U.M., Eisch, A.J., Yajima, S., Lammers, C.H., Yang, Y., Lee, S.H., Kim, Y.M., Nestler, E.J., Mouradian, M.M., et al. (2001). Dopamine receptor regulating factor, DRRF: a zinc finger transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7558-7563.
- Ikawa, M., Tanaka, N., Kao, W.W.-Y., y Verma, I.M. (2003). Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. *Mol. Ther.* 8, 666-673.
- Iversen, S.D., y Iversen, L.L. (2007). Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* 30, 188-193.
- Jackson, D.M., y Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol. Ther.* 64, 291-370.
- Jacobs, F.M.J., Veenvliet, J. V., Almirza, W.H., Hoekstra, E.J., von Oerthel, L., van der Linden, a. J. a., Neijts, R., Koerkamp, M.G., van Leenen, D., Holstege, F.C.P., et al. (2011). Retinoic acid-dependent and -independent gene-regulatory pathways of Pitx3 in meso-diencephalic dopaminergic neurons. *Development* 138, 5213-5222.
- Jakobsson, J., Georgievska, B., Ericson, C., y Lundberg, C. (2004). Lesion-dependent regulation of transgene expression in the rat brain using a human glial fibrillary acidic protein-lentiviral vector. *Eur. J. Neurosci.* 19, 761-765.
- Jeong, Y., El-Jaick, K., Roessler, E., Muenke, M., y Epstein, D.J. (2006). A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers. *Development* 133, 761-772.
- Junion, G., Spivakov, M., Girardot, C., Braun, M., Gustafson, E.H., Birney, E., y Furlong, E.E.M. (2012). A transcription factor collective defines cardiac cell fate and reflects lineage history. *Cell* 148, 473-486.

- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. a, van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., et al. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467, 430-435.
- Kawaguchi, Y. (1997). Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci. Res.* 27, 1-8.
- Kebabian, J.W., y Calne, D.B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93-96.
- Kelly, M. a., Rubinstein, M., Asa, S.L., Zhang, G., Saez, C., Bunzow, J.R., Allen, R.G., Hnasko, R., Ben-Jonathan, N., Grandy, D.K., et al. (1997). Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* 19, 103-113.
- Kim, K.S., Yoon, Y.R., Lee, H.J., Yoon, S., Kim, S.-Y., Shin, S.W., An, J.J., Kim, M.-S., Choi, S.-Y., Sun, W., et al. (2010a). Enhanced hypothalamic leptin signaling in mice lacking dopamine D2 receptors. *J. Biol. Chem.* 285, 8905-8917.
- Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J.M., Costa, A.M., Bear, D.M., Wu, J., Harmin, D. a, Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., et al. (2010b). Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* 465, 182-187.
- Kind, J., y van Steensel, B. (2010). Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 320-325.
- Kioussis, D., Vanin, E., deLange, T., Flavell, R. a., y Grosveld, F.G. (1983). β -Globin gene inactivation by DNA translocation in $\gamma\beta$ -thalassaemi. *Nature* 306, 662-666.
- Koob, G.F., y Volkow, N.D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35, 217-238.
- Kravitz, a. V., y Kreitzer, a. C. (2012). Striatal Mechanisms Underlying Movement, Reinforcement, and Punishment. *Physiology* 27, 167-177.
- Kravitz, A. V, Freeze, B.S., Parker, P.R.L., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K., y Kreitzer, A.C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622-626.
- Krivega, I., y Dean, A. (2012). Enhancer and promoter interactions-long distance calls. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 79-85.
- Krysinska, H., Hoogenkamp, M., Ingram, R., Wilson, N., Tagoh, H., Laslo, P., Singh, H., y Bonifer, C. (2007). A two-step, PU.1-dependent mechanism for developmentally regulated chromatin remodeling and transcription of the c-fms gene. *Mol. Cell. Biol.* 27, 878-887.
- Lam, Daniel D., Flavio SJ de Souza, Sofia Nasif, Miho Yamashita, Rodrigo López-Leal, Veronica Otero-Corchon, Kana Meece et al. (2015). Partially Redundant Enhancers Cooperatively Maintain Mammalian Pomc Expression Above a Critical Functional Threshold. *PLoS genetics* 11, no. 2: e1004935-e1004935.
- Langlais, D., Couture, C., Sylvain-Drolet, G., y Drouin, J. (2011). A pituitary-specific enhancer of the POMC gene with preferential activity in corticotrope cells. *Mol. Endocrinol.* 25, 348-359.

- Larkin, M. a., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., Mcgettigan, P. a., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, a., Lopez, R., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lenhard, B., Sandelin, A., y Carninci, P. (2012). Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* 13, 233-245.
- Lettice, L. a., Heaney, S.J.H., Purdie, L. a., Li, L., de Beer, P., Oostra, B. a., Goode, D., Elgar, G., Hill, R.E., y de Graaff, E. (2003). A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1725-1735.
- Levine, M. (2010). Transcriptional enhancers in animal development and evolution. *Curr. Biol.* 20, R754-R763.
- Liang, S.-L., Hsu, S.-C., y Pan, J.-T. (2014). Involvement of dopamine D2 receptor in the diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity and prolactin secretion in female rats. *J. Biomed. Sci.* 21, 37.
- Lobo M.K., Karsten S.L., Gray M., Geschwind D.H. y Yang X.W.. (2006). FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains. *Nature neuroscience* 9(3), 443-452.
- Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J., y Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-872.
- Long, J.E., Swan, C., Liang, W.S., Cobos, I., Potter, G.B., y Rubenstein, J.L.R. (2009). Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control striatal patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *J. Comp. Neurol.* 512, 556-572.
- Luo, A.H., Tahsili-Fahadan, P., Wise, R.A., Lupica, C.R., y Aston-Jones, G. (2011). Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science* 333, 353-357.
- Luskin, M.B., y Price, J.L. (1983). The laminar distribution of intracortical fibers originating in the olfactory cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 216, 292-302.
- Madisen, L., Zwingman, T. a, Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H. a, Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* 13, 133-140.
- Marinić, M., Aktas, T., Ruf, S., y Spitz, F. (2013). An Integrated Holo-Enhancer Unit Defines Tissue and Gene Specificity of the Fgf8 Regulatory Landscape. *Dev. Cell* 24, 530-542.
- Matamales, M., Bertran-Gonzalez, J., Salomon, L., Degos, B., Deniau, J.-M., Valjent, E., Hervé, D., y Girault, J.-A. (2009). Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. *PLoS One* 4, e4770.
- Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A.W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D.J., Buchman, S., Chen, C.Y., Chou, A., Ienasescu, H., et al. (2014). JASPAR 2014: An extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 42, D142-D147.

- Matthews, P.R., y Harrison, P.J. (2012). A morphometric, immunohistochemical, and in situ hybridization study of the dorsal raphe nucleus in major depression, bipolar disorder, schizophrenia, and suicide. *J. Affect. Disord.* 137, 125-134.
- Meador-Woodruff, J.H. (1989). Distribution of D2 Dopamine Receptor mRNA in Rat Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 7625-7628.
- De Mei, C., Ramos, M., Iitaka, C., y Borrelli, E. (2009). Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 53-58.
- Merika, M., y Thanos, D. (2001). Enhanceosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 205-208.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., y Dopamine, M.G.C. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189-225.
- Miyoshi, G., y Fishell, G. (2006). Directing neuron-specific transgene expression in the mouse CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 577-584.
- Le Moine, C., y Bloch, B. (1995). D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.* 355, 418-426.
- Monsma, F.J., McVittie, L.D., Gerfen, C.R., Mahan, L.C., y Sibley, D.R. (1989). Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342, 926-929.
- Montavon, T., Soshnikova, N., Mascrez, B., Joye, E., Thevenet, L., Splinter, E., De Laat, W., Spitz, F., y Duboule, D. (2011). A regulatory archipelago controls hox genes transcription in digits. *Cell* 147, 1132-1145.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109.
- Naldini, L., Blömer, U., Gage, F.H., Trono, D., y Verma, I.M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11382-11388.
- Noaín, D., Avale, M. E., Wedemeyer, C., Calvo, D., Peper, M., y Rubinstein, M. (2006). Identification of brain neurons expressing the dopamine D4 receptor gene using BAC transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*, 24(9), 2429-2438.
- Nord, A.S., Pattabiraman, K., Visel, A., y Rubenstein, J.L.R. (2015). Review Genomic Perspectives of Transcriptional Regulation in Forebrain Development. *Neuron* 85, 27-47.
- Nott, A., Le Hir, H., y Moore, M.J. (2004). Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev.* 18, 210-222.
- Ong, Chin-Tong, and Victor G. Corces. (2014). "CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function." *Nature Reviews Genetics* 15(4), 234-246.
- Overstreet LS, Hentges ST, Bumashny VF, de Souza FS, Smart JL, Santangelo AM, Low MJ, Westbrook GL y Rubinstein M. (2004). A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus. *The Journal of neuroscience* 24(13), 3251-3259.

- Pashos, E., Park, J.T., Leach, S., y Fisher, S. (2013). Distinct enhancers of *ptf1a* mediate specification and expansion of ventral pancreas in zebrafish. *Dev. Biol.* 381, 471-481.
- Paxinos, G., y Franklin, K. B. (2004). The mouse brain in stereotaxic coordinates. Gulf Professional Publishing.
- Pennacchio, L. a, Ahituv, N., Moses, A.M., Prabhakar, S., Nobrega, M. a, Shoukry, M., Minovitsky, S., Dubchak, I., Holt, A., Lewis, K.D., et al. (2006). In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature* 444, 499-502.
- Pennacchio, L. a, Bickmore, W., Dean, A., Nobrega, M. a, y Bejerano, G. (2013). Enhancers: five essential questions. *Nat. Rev. Genet.* 14, 288-295.
- Perry, M.W., Boettiger, A.N., Bothma, J.P., y Levine, M. (2010). Shadow enhancers foster robustness of *Drosophila* gastrulation. *Curr. Biol.* 20, 1562-1567.
- Petrykowska, H.M., Vockley, C.M., y Elnitski, L. (2008). Detection and characterization of silencers and enhancer-blockers in the greater CFTR locus. *Genome Res.* 18, 1238-1246.
- Piredda, S., y Gale, K. (1985) A crucial epileptogenic site in the deep prepiriform cortex. *Nature* 317, 623-625.
- Preskorn, S.H. (2006). Pharmacogenomics, informatics, and individual drug therapy in psychiatry: past, present and future. *J. Psychopharmacol.* 20, 85-94.
- Quentien, M.H., Barlier, A., Franc, J.L., Pellegrini, I., Brue, T., y Enjalbert, A. (2006). Pituitary transcription factors: from congenital deficiencies to gene therapy. *J. Neuroendocrinol.* 18, 633-642.
- Redgrave, P., Prescott, T.J., y Gurney, K. (1999). The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience* 89, 1009-1023.
- Renard, G.M., Sotomayor-Zarate, R., Blanco, E.H., y Gysling, K. (2014). Withdrawal from chronic amphetamine reduces dopamine transmission in the rat lateral septum. *J. Neurosci. Res.* 92, 937-943.
- Rice, M.E., Patel, J.C., y Cragg, S.J. (2011). Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198, 112-137.
- Richtand, N.M., Welge, J.A., Logue, A.D., Keck, P.E., Strakowski, S.M., y McNamara, R.K. (2007). Dopamine and serotonin receptor binding and antipsychotic efficacy. *Neuropsychopharmacology* 32, 1715-1726.
- Rinaldi, A., Mandillo, S., Oliverio, A., y Mele, A. (2007). D1 and D2 receptor antagonist injections in the prefrontal cortex selectively impair spatial learning in mice. *Neuropsychopharmacology* 32, 309-319.
- Rondou, P., Haegeman, G., y Van Craenenbroeck, K. (2010). The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1971-1986.
- Roth, B.L., Sheffler, D.J., y Kroeze, W.K. (2004). Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 353-359.
- Rubinstein, M., y de Souza, F.S.J. (2013). Evolution of transcriptional enhancers and animal diversity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20130017.

- Sagai, T., Hosoya, M., Mizushina, Y., Tamura, M., y Shiroishi, T. (2005). Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb. *Development* 132, 797-803.
- Samad, T.A., Krezel, W., Chambon, P., y Borrelli, E. (1997). Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: Activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14349-14354.
- Sano, H., Yasoshima, Y., Matsushita, N., Kaneko, T., Kohno, K., Pastan, I., y Kobayashi, K. (2003). Conditional ablation of striatal neuronal types containing dopamine D2 receptor disturbs coordination of basal ganglia function. *J. Neurosci.* 23, 9078-9088.
- Schmidt, D., Wilson, M.D., Ballester, B., Schwalie, P.C., Brown, G.D., Marshall, A., Kutter, C., Watt, S., Martinez-Jimenez, C.P., Mackay, S., et al. (2010). Five-vertebrate ChIP-seq reveals the evolutionary dynamics of transcription factor binding. *Science* 328, 1036-1040.
- Schmidt, E.F., Kus, L., Gong, S., y Heintz, N. (2013). BAC transgenic mice and the GENSAT database of engineered mouse strains. *Cold Spring Harb. Protoc.* 8, 200-206.
- Schubert, D., Martens, G.J.M., y Kolk, S.M. (2014). Molecular underpinnings of prefrontal cortex development in rodents provide insights into the etiology of neurodevelopmental disorders. *Mol. Psychiatry* 1-15.
- Seeman, P. (1987). Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1, 133-152.
- Seeman, P., Lee, T., Chau-Wong, M., y Wong, K. (1976). Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261, 717-719.
- Semenza, G.L., Delgrosso, K., Poncz, M., Malladi, P., Schwartz, E., y Surrey, S. (1984). The silent carrier allele: beta thalassemia without a mutation in the beta-globin gene or its immediate flanking regions. *Cell* 39, 123-128.
- Seo, S., Lomber, G., Mathison, A., Buttar, N., Podratz, J., Calvo, E., Iovanna, J., Brimijoin, S., Windebank, A., y Urrutia, R. (2012). Krüppel-like factor 11 differentially couples to histone acetyltransferase and histone methyltransferase chromatin remodeling pathways to transcriptionally regulate dopamine D2 receptor in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 287, 12723-12735.
- Shen, Y., Yue, F., McCleary, D.F., Ye, Z., Edsall, L., Kuan, S., Wagner, U., Dixon, J., Lee, L., Lobanenkov, V. V., et al. (2012). A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature* 488, 116-120.
- Shuen, J. a, Chen, M., Gloss, B., y Calakos, N. (2008). *Drd1a*-tdTomato BAC transgenic mice for simultaneous visualization of medium spiny neurons in the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *J. Neurosci.* 28, 2681-2685.

- Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J.S., Hinrichs, A.S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L.W., Richards, S., et al. (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* 15, 1034-1050.
- Smidt, M.P., y Burbach, J.P.H. (2007). How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 21-32.
- Smith, a D., y Bolam, J.P. (1990). The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci.* 13, 259-265.
- Smith, E., y Shilatifard, A. (2014). Enhancer biology and enhanceropathies. *Nature structural & molecular biology*, 21(3), 210-219.
- Smits, S.M., Ponnio, T., Conneely, O.M., Burbach, J.P.H., y Smidt, M.P. (2003). Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1731-1738.
- Snyder, S.H., Taylor, K.M., Coyle, J.T., y Meyerhoff, J.L. (1970). The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am. J. Psychiatry* 127, 199-207.
- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.P., Bouthenet, M.L., y Schwartz, J.C. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347, 146-151.
- Sotomayor-Zárate, R., Araya, K.A., Pereira, P., Blanco, E., Quiroz, G., Pozo, S., Carreño, P., Andrés, M.E., Forray, M.I., y Gysling, K. (2010). Activation of GABA-B receptors induced by systemic amphetamine abolishes dopamine release in the rat lateral septum. *J. Neurochem.* 114, 1678-1686.
- Sotomayor-Zárate, R., Renard, G.M., Araya, K.A., Carreño, P., Fuentealba, J.A., Andrés, M.E., y Gysling, K. (2013). Long-term loss of dopamine release mediated by CRF-1 receptors in the rat lateral septum after repeated cocaine administration. *Behav. Brain Res.* 250, 206-210.
- de Souza FS, Santangelo AM, Bumashny V, Avale ME, Smart JL, Low MJ y Rubinstein M. (2005). Identification of Neuronal Enhancers of the Proopiomelanocortin Gene by Transgenic Mouse Analysis and Phylogenetic Footprinting. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3076-3086.
- Sparwasser, T., y Eberl, G. (2007). BAC to immunology - Bacterial artificial chromosome-mediated transgenesis for targeting of immune cells. *Immunology* 121, 308-313.
- Stevens, J.R., Phillips, I., y de Beaurepaire, R. (1988). gamma-Vinyl GABA in endopiriform area suppresses kindled amygdala seizures. *Epilepsia* 29, 404-411.
- Sugai, T., Yamamoto, R., Yoshimura, H., y Kato, N. (2012). Multimodal cross-talk of olfactory and gustatory information in the endopiriform nucleus in rats. *Chem. Senses* 37, 681-688.
- Sunahara, R.K., Guan, H.C., O'Dowd, B.F., Seeman, P., Laurier, L.G., Ng, G., George, S.R., Torchia, J., Van Tol, H.H., y Niznik, H.B. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350, 614-619.

- Tagoh, H., Schebesta, A., Lefevre, P., Wilson, N., Hume, D., Busslinger, M., y Bonifer, C. (2004). Epigenetic silencing of the c-fms locus during B-lymphopoiesis occurs in discrete steps and is reversible. *EMBO J.* 23, 4275-4285.
- Takeuchi, Y., Miyamoto, E., y Fukunaga, K. (2002). Activation of the rat dopamine D2 receptor promoter by mitogen-activated protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II pathways. *J. Neurochem.* 83, 784-796.
- Thibault, Dominic, Fabien Loustalot, Guillaume M. Fortin, Marie-Josée Bourque, y Louis-Eric Trudeau. (2013). Evaluation of D1 and D2 dopamine receptor segregation in the developing striatum using BAC transgenic mice. *PloS one* 8, no. 7 : e67219.
- Tiberi, M., Jarvie, K.R., Silvia, C., Falardeau, P., Gingrich, J. a, Godinot, N., Bertrand, L., Yang-Feng, T.L., Freneau, R.T., y Caron, M.G. (1991). Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7491-7495.
- Tolu, S., Avale, M.E., Nakatani, H., Pons, S., Parnaudeau, S., Tronche, F., Vogt, A., Monyer, H., Vogel, R., de Chaumont, F., et al. (2010). A versatile system for the neuronal subtype specific expression of lentiviral vectors. *FASEB J.* 24, 723-730.
- Van Tol, H.H., Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Niznik, H.B., y Civelli, O. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350, 610-614.
- Van Tol, H.H., Wu, C.M., Guan, H.C., Ohara, K., Bunzow, J.R., Civelli, O., Kennedy, J., Seeman, P., Niznik, H.B., y Jovanovic, V. (1992). Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358, 149-152.
- Usiello, a, Baik, J.H., Rougé-Pont, F., Picetti, R., Dierich, a, LeMeur, M., Piazza, P. V, y Borrelli, E. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408, 199-203.
- Valdenaire, O., Vernier, P., Maus, M., Dumas Milne Edwards, J.B., y Mallet, J. (1994). Transcription of the rat dopamine-D2-receptor gene from two promoters. *Eur. J. Biochem.* 220, 577-584.
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Fisone, G., y Girault, J.A. (2009). Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* 32, 538-547.
- Vallar, L., y Meldolesi, J. (1989). Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 74-77.
- Veenvliet, J.V.J., Dos Santos, M.T.M.A., Kouwenhoven, W.M., von Oerthel, L., Lim, J.L., van der Linden, A.J. a, Koerkamp, M.J. a G., Holstege, F.C.P., y Smidt, M.P. (2013). Specification of dopaminergic subsets involves interplay of En1 and Pitx3. *Development* 140, 3373-3384.
- Villar, D., Berthelot, C., Flicek, P., Odom, D.T., Villar, D., Berthelot, C., Aldridge, S., Rayner, T.F., Lukk, M., y Pignatelli, M. (2015). Enhancer Evolution across 20 Mammalian Species. *Cell* 160, 554-566.

- Visel, A., Prabhakar, S., Akiyama, J. a, Shoukry, M., Lewis, K.D., Holt, A., Plajzer-Frick, I., Afzal, V., Rubin, E.M., y Pennacchio, L. a (2008). Ultraconservation identifies a small subset of extremely constrained developmental enhancers. *Nat. Genet.* 40, 158-160.
- Visel, A., Rubin, E.M., y Pennacchio, L. a (2009a). Genomic views of distant-acting enhancers. *Nature* 461, 199-205.
- Visel, A., Blow, M.J., Li, Z., Zhang, T., Akiyama, J. a, Holt, A., Plajzer-Frick, I., Shoukry, M., Wright, C., Chen, F., et al. (2009b). ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature* 457, 854-858.
- Vokes, S. a., Ji, H., Wong, W.H., y McMahon, A.P. (2008). A genome-scale analysis of the cis-regulatory circuitry underlying sonic hedgehog-mediated patterning of the mammalian limb. *Genes Dev.* 22, 2651-2663.
- Wang, S., Zhao, Y., Leiby, M., y Zhu, J. (2009). A new positive/negative selection scheme for precise BAC recombineering. *Mol. Biotechnol.* 42, 110-116.
- Wang, Z., Kai, L., Day, M., Ronesi, J., Yin, H.H., Ding, J., Tkatch, T., Lovinger, D.M., y Surmeier, D.J. (2006). Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron* 50, 443-452.
- Warming, S., Costantino, N., Court, D.L., Jenkins, N. a., y Copeland, N.G. (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res.* 33, 1-12.
- Wasserman, W.W., y Sandelin, A. (2004). Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat. Rev. Genet.* 5, 276-287.
- Weiner, D.M., Levey, a. I., Sunahara, R.K., Niznik, H.B., O'Dowd, B.F., Seeman, P., y Brann, M.R. (1991). D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 1859-1863.
- Wiegand, H.L., Lu, S., y Cullen, B.R. (2003). Exon junction complexes mediate the enhancing effect of splicing on mRNA expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 , 11327-11332.
- Yang, X.W., y Gong, S. (2005). An overview on the generation of BAC transgenic mice for neuroscience research. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 5, Unit 5.20.
- Yang, X.W., Model, P., y Heintz, N. (1997). Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat. Biotechnol.* 15, 859-865.
- Yue, F., Cheng, Y., Breschi, A., Vierstra, J., Wu, W., Ryba, T., Sandstrom, R., Ma, Z., Davis, C., Pope, B.D., et al. (2014). A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* 515, 355-364.
- Zaret, K.S., y Carroll, J.S. (2011). Pioneer transcription factors: Establishing competence for gene expression. *Genes Dev.* 25, 2227-2241.

- Zhao, C., Eisinger, B., y Gammie, S.C. (2013). Characterization of GABAergic neurons in the mouse lateral septum: a double fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical study using tyramide signal amplification. PLoS One 8, e73750.
- Zhou, Q.Y., Grandy, D.K., Thamby, L., Kushner, J. a, Van Tol, H.H., Cone, R., Pribnow, D., Salon, J., Bunzow, J.R., y Civelli, O. (1990). Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. Nature 347, 76-80.